



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA  Facultat de  
Farmàcia

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y  
Medicina Legal

**Bioactividad en dianas terapéuticas sistémicas e intestinales de una  
bebida funcional conteniendo  $\beta$ -criptoxantina, esteroides vegetales y  
galactooligosacáridos**

*Bioactivity in systemic and intestinal therapeutic targets of a functional  
beverage containing  $\beta$ -cryptoxanthin, plant sterols and  
galactooligosaccharides*

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN  
TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

Presentada por:

**Gabriel López García**

Dirigida por:

**Dr. Antonio Cilla Tatay**

**Dra. Amparo Alegría Torán**

**Dra. Reyes Barberá Sáez**

Burjassot, febrero 2020



El Dr. Antonio Cilla Tatay y las Dras. Amparo Alegría Torán y Reyes Barberá Sáez, Profesor Titular y Catedráticas, respectivamente, del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València

### **CERTIFICAN QUE:**

El graduado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, D. Gabriel López García, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título **“Bioactividad en dianas terapéuticas sistémicas e intestinales de una bebida funcional conteniendo  $\beta$ -criptoxantina, esteroides vegetales y galactooligosacáridos”**. El trabajo ha dado lugar a siete artículos publicado en los cuales firma como primer autor.

1. *Protective effect of antioxidants contained in milk-based fruit beverages against sterol oxidation products. Journal of Functional Foods (2017), 30, 81-89.*  
Índice de impacto JCR (2017): 3,470 (16/133) Q1. Food Science & Technology.
2. *Antiproliferative effect of plant sterols at colonic concentrations on Caco-2 cells. Journal of Functional Foods (2017), 39, 84-90.*  
Índice de impacto JCR (2017): 3,470 (16/133) Q1. Food Science & Technology.
3. *Effects of plant sterols and/or  $\beta$ -cryptoxanthin at physiological serum concentrations on suicidal erythrocyte death. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2018), 66, 1157–1166.*  
Índice de impacto JCR (2018): 3,571 (28/135) Q1. Food Science & Technology.
4. *The impact of galactooligosaccharides on the bioaccessibility of sterols in a plant sterol-enriched beverage: adaptation of the harmonized INFOGEST digestion method. Food & Function (2018), 9, 2080-2089.*  
Índice de impacto JCR (2018): 3,241 (31/135) Q1. Food Science & Technology.
5. *Effect of milk-based fruit beverages enriched with plant sterols and/or galactooligosaccharides in a murine chronic colitis model. Foods (2019), 8, 114.*  
*Doi:10.3390/foods8040114.*  
Índice de impacto JCR (2018): 3,011 (36/135) Q1. Food Science & Technology.
6. *Anti-inflammatory and cytoprotective effect of plant sterol and galactooligosaccharides-enriched beverages in Caco-2 cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2019).*  
*Doi: 10.1021/acs.jafc.9b03025 (in press).*  
Índice de impacto JCR (2018): 3,571 (28/135) Q1. Food Science & Technology.
7. *Effect of plant sterol and galactooligosaccharides enriched beverages on oxidative stress and longevity in Caenorhabditis elegans. Journal of Functional Foods (2020), 65, 103747.*  
Índice de impacto JCR (2018): 3,197 (33/135) Q1. Food Science & Technology.

Autorizan la presentación de la Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor en Ciencias de la Alimentación.

Y para que conste a los efectos oportunos,

En Burjassot, 17 de febrero de 2020

Fdo: Antonio Cilla Tatay

Fdo: Amparo Alegría Torán

Fdo: Reyes Barberá Sáez



El Dr. Antonio Cilla Tatay y las Dras. Amparo Alegría Torán y Reyes Barberá Sáez, Profesor Titular y Catedráticas, respectivamente, del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València

### **INFORMAN QUE:**

El graduado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos D. Gabriel López García ha contribuido:

- En el trabajo que lleva por título “*Effects of plant sterols and/or  $\beta$ -cryptoxanthin at physiological serum concentrations on suicidal erythrocyte death*” a partes iguales con Dña. Andrea Álvarez-Sala Martín.
- En el trabajo que lleva por título “*The impact of galactooligosaccharides on the bioaccessibility of sterols in a plant sterol-enriched beverage: adaptation of the harmonized INFOGEST digestion method*” a partes iguales con Dña. Virginia Blanco Morales.

En ambos artículos, D. Gabriel López García ha participado en la parte experimental, evaluación de los resultados y la discusión, así como en la redacción de los dos artículos. El trabajo “*Effects of plant sterols and/or  $\beta$ -cryptoxanthin at physiological serum concentrations on suicidal erythrocyte death*” ha sido utilizado en la tesis doctoral defendida en la Universitat de València en 2018 por Dña. Andrea Álvarez-Sala Martín y que lleva por título “Biodisponibilidad y efectos biológicos de esteroides en bebidas funcionales”.

En Burjassot, 17 de febrero de 2020

Fdo: Antonio Cilla Tatay

Fdo: Amparo Alegría Torán

Fdo: Reyes Barberá Sáez

El Dr. Antonio Cilla Tatay y las Dras. Amparo Alegría Torán y Reyes Barberá Sáez, Profesor Titular y Catedráticas, respectivamente, del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València

### **INFORMAN QUE:**

La presente Tesis Doctoral Internacional se ha realizado en el grupo Bionutest (03/003) y se enmarca en los proyectos AGL2012-39503-C02-01 y AGL2015-68006-C2-1-R, financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

El doctorando Gabriel López García ha disfrutado de una ayuda para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral dentro del Programa VALI+D (ACIF/2015/449) de la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana, en el periodo entre julio 2016-2019 (Resolución de 16 de junio 2016).

El doctorando Gabriel López García ha disfrutado de una beca para estancias predoctorales de la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana financiadas por el Fondo Social Europeo: Estancia Internacional (BEFPI/2019/009) (Resolución de 14 de marzo 2019) realizada en la *School of Food Science and Nutrition, University of Leeds*, Leeds (Reino Unido), entre los meses de febrero y junio de 2019.



**UNIVERSITY OF LEEDS**

En Burjassot, 17 de febrero de 2020

Fdo: Antonio Cilla Tatay

Fdo: Amparo Alegría Torán

Fdo: Reyes Barberá Sáez

## AGRADECIMIENTOS

Quizás la parte más complicada de escribir de toda la tesis. Tengo tantas cosas que agradecer y a tanta gente, que espero que en estas pocas palabras quede reflejado todo lo que me habéis aportado estos años.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis Reyes, Amparo y Toni por darme la oportunidad de crecer como científico junto a vosotros y enseñarme la importancia de ser siempre riguroso en todo lo que hacemos. En particular, querría agradecer a Reyes por haber tenido siempre la puerta abierta, por despejar todas mis dudas con un “coge un boli y un papel” y sobre todo por tu paciencia a la hora de corregir. Nunca olvidaré algunas palabras y frases como “OJO” y “al grano, no seas *rococó*”. A Amparo por inculcarme la importancia de ser meticuloso en mi trabajo y enseñarme desde cómo hacer un informe o un protocolo hasta cómo debe ser un buen docente. Aunque todavía me queda mucho por aprender, me llevo con gran cariño todos los consejos (profesionales y de la vida) que me has ido dando a lo largo de estos años. Y por último, pero no por ello menos importante, a Toni por ser mi gran maestro de cultivos celulares y de lo que surja. Te estoy muy agradecido por todo lo que has hecho estos seis años, por estar a pie de pista en todo momento y haber confiado en mí desde el principio. Y por supuesto por tu toque de humor y tus chistes, que siempre le alegran a uno el día.

Me siento afortunado de haber llegado hasta aquí junto a vosotros y para mí seréis siempre un referente como investigadores, docentes y sobre todo como personas: ¡MUCHAS GRACIAS POR TODO!

También me gustaría dar las gracias a otros miembros del grupo como M<sup>a</sup> Jesús y Lupe. A M<sup>a</sup> Jesús por su sabiduría sobre los esteroides, óxidos, metabolitos y mil cosas más, que, con su dulzura natural y paciencia, me ha transmitido durante estos años de tesis. A Lupe por tener siempre una sonrisa en el laboratorio y una palabra de ánimo en el momento indicado.

Por supuesto agradecer a todos los *compis* del laboratorio por ese apoyo incondicional y esos momentos de risas y complicidad. Comenzaré por Lorena, una gran persona de la que aprendí que con paciencia y trabajo duro todo se puede conseguir en la vida. A Andrea, por esos momentos de risas escribiendo y por ese gusto musical que solamente nosotros entendemos y que prefiero mantener en el anonimato (*jijiji*). María, o como todos la conocemos “*Marieta*” de ti sólo puedo decir una cosa “Pon una María en tu vida y todo te irá genial”. Eres todo un ejemplo de humildad y superación personal y profesional, y conozco pocas personas que amen tanto la ciencia como tú lo haces. Muchas gracias por ser cómo eres y por abrirme los brazos el primer día que pisé el laboratorio. Islam, siempre

recordaré nuestras charlas sobre religión y ciencia, nutrición y digestiones, ¡qué paciencia la tuya! Gracias por tu ayuda con la estadística y por transmitirme tu amor por la nutrición. Virginia, alias “*Virgi*” para los amigos, una de esas personas que sólo encuentras una vez en la vida. Me faltan palabras para agradecerte tanto, pero si me tengo que quedar con algo fue cuando tuve el placer de trabajar junto a ti con las digestiones o cuando me enseñaste a saponificar con los embudos...creo que no me he reído tanto en mi vida. Aunque sé que no te gusta que te lo digan, eres todo un ejemplo de dedicación y esfuerzo y sé que con esas cualidades llegarás muy lejos. Gracias por transmitirme esos valores y por tu cariño incondicional día tras día. Raquel, nuestra querida “*Dramar Queen*”, gracias por deleitarnos con tu voz y llenar el laboratorio con tu alegría y sensibilidad. Maira, la chica más dulce y “estupenda” que he conocido nunca. Me encantan nuestras conversaciones y debates *frikis* sobre Harry Potter, ¡Viva Capa Invisible! A Clara, que ha entrado fuerte al laboratorio y para quedarse, sólo decirte que gracias por ser tan auténtica y sincera, sé que te irá todo genial. Y agradecer también a Laura, mi amiga de la infancia y compañera de doctorado del IATA, por esas charlas sobre ciencia que parecían que solucionarían el mundo y por esos días escribiendo la tesis codo con codo en la biblioteca. Contigo soy capaz de pasármelo bien hasta cuando estamos a “*tope*”.

Un abrazo enorme a todas las personas que han trabajado en algún momento junto a mí: Juana Carbonell, Camila Lessa, Magda Buniowska, Daniel Bedolla, Elisa Caetano, Francesca Iaquinta, Beatriz de la Fuente, Eva Grau, Leidy Gómez, Natalia Gómez, Eleonwra Deli, Eleni Arxontoulaki... y otros muchos. Gracias por hacer que el laboratorio se convierta en algo más que un lugar de trabajo.

Quisiera agradecer a ADM Biopolis y en particular a Salvador y Patricia (sin olvidarme de Nuria, Roberto y María) por abrirme las puertas de su laboratorio, enseñarme tanto sobre el “gusanito” y sobre todo por ser personas tan encantadoras. Un agradecimiento especial a M<sup>a</sup> Carmen Recio por toda su ayuda y disposición, incluso cuando tenía entre manos su oposición para la cátedra. También gracias por transmitirme la calma necesaria para trabajar con ratones y enseñarme todo lo que sé del modelo murino.

Gracias a M<sup>a</sup> José y Ana Frígola por los consejos que me habéis dado, por vuestra sinceridad y por esas horas de tertulia en el que el tiempo parecía que volaba. A Cristina y Ana Juan gracias por aguantar mi “disimulado” tono de voz en el laboratorio y las largas charlas con *Virgi* al lado de vuestros despachos. A todas las chicas de la sección de cultivos celulares, y en especial a Carmen, gracias por el trato tan humano que me habéis brindado, sois simplemente geniales. También a esas maravillosas personas de la secretaría del departamento (Carmen, Amparo, Juanjos, Gema, Ester...) por hacer nuestra vida un poco más sencilla y salvarnos de más de una situación crítica. Agradecer a



Yoli y Carmen por, además de dejar el laboratorio como “los chorros del oro”, llegar cada mañana con esa alegría y con algún que otro cotilleo nuevo...me encantáis.

Pero el mayor de los agradecimientos es para mi familia, en especial a mi madre y hermano por estar a mi lado en cada momento y regalarme esas palabras de aliento para continuar adelante. A mi cuñada y a Paco por sacarme siempre una sonrisa y hacerme reír como sólo vosotros sabéis. Y por supuesto, a mi querido sobrino “Danielin” que con solo un año y seis meses de edad ha revolucionado a la familia (y alguna que otra personilla del laboratorio) y nos tiene a todos enamorados. Me gustaría hacer una mención especial a mi novio David por su incalculable apoyo emocional y por motivarme a ser cada día mejor investigador, sin duda has sido una pieza clave en este camino. Gracias por transmitirme tu amor por la ciencia y el pensamiento científico, y sobre todo hacerme sentir que valgo de verdad para esto.

No me gustaría olvidarme Cecilia, Pablo y Carlos, gracias por hacerme sentir parte de vuestra maravillosa familia desde el primer día y alegrarme los días de escritura con una buena paella, arroz al horno o *torrá*. Sencillamente no podría haber encontrado mejores personas que vosotros, ¡Gracias por todo!



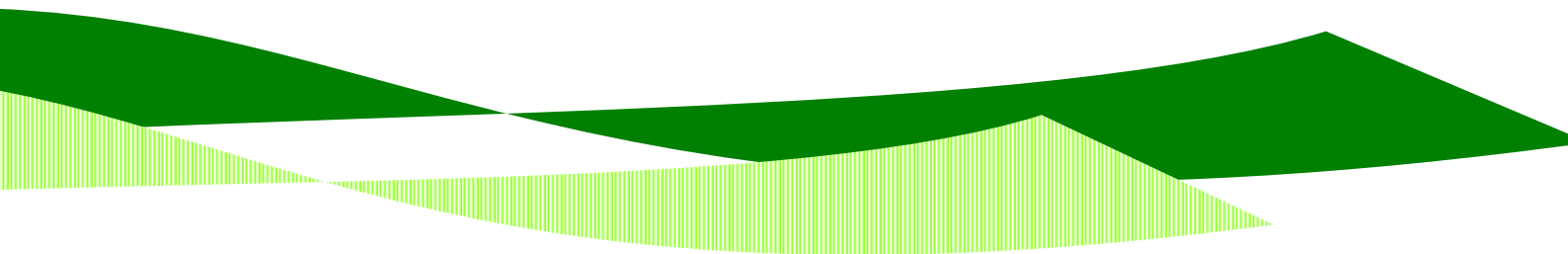
**ME ENSEÑARON QUE EL CAMINO DEL  
PROGRESO NO ES NI RÁPIDO NI FÁCIL**

*Marie Curie*



Índices

*Indexes*





## ÍNDICE GENERAL/ *GENERAL INDEX*

Índice de figuras y tablas/ <i>Figure and table index</i> .....	IV
Abreviaturas/ <i>Abbreviatures</i> .....	V
Resumen/ <i>Abstract</i> .....	1
Objetivos/ <i>Objectives</i> .....	7
Antecedentes bibliográficos/ <i>Literature review</i> .....	11
1. Introducción.....	13
2. Esteroles vegetales.....	14
2.1 Estructura química y fuentes dietéticas .....	14
2.1 Óxidos de esteroles.....	16
3. Galactooligosacáridos.....	19
4. Metabolismo .....	20
4.1 Esteroles .....	20
4.2 Galactooligosacáridos .....	23
5. Bioaccesibilidad.....	23
5.1 Bioaccesibilidad de esteroles vegetales.....	24
5.2 Método armonizado de digestión gastrointestinal estático: Infogest .....	26
6. Efectos biológicos de esteroles vegetales y galactooligosacáridos .....	30
6.1 Modelos biológicos .....	31
6.2 Hipocolesterolemiante.....	33
6.3 Antiproliferativo y anticanceroso .....	34
6.4 Antiinflamatorio a nivel intestinal.....	41
6.5 Antieriptótico.....	48
6.6 Otros efectos.....	51
Diseño experimental y difusión de resultados/ <i>Experimental design and results dissemination</i> .....	53
Resultados y discusión/ <i>Results and discussion</i> .....	57
Conclusiones/ <i>Conclusions</i> .....	77
Bibliografía/ <i>References</i> .....	83
Anexo/ <i>Annexe I: Artículos publicados/Published articles</i> .....	103
Anexo/ <i>Annexe II: Comunicaciones a congresos/ Congress communications</i> .....	191

## ÍNDICE DE FIGURAS/ *FIGURE INDEX*

<b>Figura 1.</b> Estructura química de los esteroides dietéticos mayoritarios.....	15
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de autooxidación de los esteroides en alimentos .....	17
<b>Figura 3.</b> Formación enzimática de galactooligosacáridos a partir de lactosa.....	19
<b>Figura 4.</b> Metabolismo de los esteroides.....	22
<b>Figura 5.</b> Digestión gastrointestinal estandarizada Infogest .....	28
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de acción propuestos para los esteroides vegetales en células de cáncer de colon humano.....	38
<b>Figura 7.</b> Señalización celular de los procesos eritrocíticos producidos por los diferentes inductores (estrés osmótico, oxidativo y depleción energética) y actividad trombogénica de los eritrocitos eritrocíticos.....	49
<b>Figure 8.</b> Description of the working plan followed to address the objectives of this Doctoral Thesis .....	55
<b>Figure 9.</b> Dissemination of results .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS/ *TABLE INDEX*

<b>Tabla 1.</b> Recopilación de estudios que evalúan el efecto de los esteroides vegetales y galactooligosacáridos sobre las EII en modelo murino .....	43
---	----



## **ABREVIATURAS/ ABBREVIATURES**

**ABCG5 y ABCG8:** transportadores Casete de unión Adenosina Trifosfato 5 y 8

**ACAT-2:** acil-coenzima A colesterol aciltransferasa 2

**AGCC:** ácidos grasos de cadena corta

**BF:** *bioaccessible fractions*

**COPs:** óxidos del colesterol; *cholesterol oxidation products*

**COX-2:** ciclooxigenasa-2

**CU:** colitis ulcerosa

**β-Cx:** β-criptoxantina; *β-criptoxanthin*

**DAI:** *disease activity index*

**DSS:** sulfato de dextrano sódico; *dextran sulphate sodium*

**EC:** enfermedad de Crohn

**EII:** enfermedades inflamatorias intestinales

**EV:** esteroides vegetales

**5-FU:** 5-fluorouracilo

**FOS:** fructooligosacáridos; *fructooligosaccharides*

**FSG:** fluido sintético gástrico

**FSI:** fluido sintético intestinal

**FSO:** fluido sintético oral

**GOS:** galactooligosacáridos; *galactooligosaccharides*

**GP:** grado de polimerización

**GSH:** glutatión reducida; *reduced glutathione*

**IIGP:** *insulin/insulin-like growth factor pathway*

**iNOS:** especies reactivas del nitrógeno

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**LPS:** lipopolisacárido bacteriano

**MDA:** malondialdehído

**MFGM:** membrana del glóbulo graso; *milk-fat globule membrane*

**MPO:** mieloperoxidasa; *myeloperoxidase*

**NF-κB:** factor nuclear κB; *nuclear factor κB*

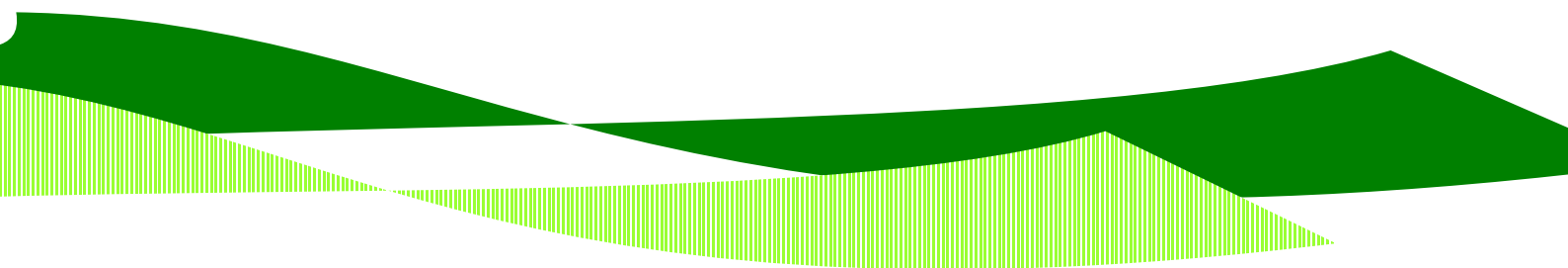
**NOX-1:** *NADPH oxidase 1*

**NPC1L1:** *Niemann-Pick C1-like protein 1*

**PAF:** factor de agregación plaquetaria  
**PC:** fosfatidilcolina  
**PGE2:** prostaglandina E2  
**PhS:** fosfatidilserina  
**PKC:** proteína quinasa C  
**PLA2:** fosfolipasa A2  
**POPs:** óxidos de esteroides vegetales; *phytosterol oxidation products*  
**PS:** *plant sterols*  
**ROS:** especies reactivas del oxígeno; *reactive oxygen species*  
**SM:** esfingomielina  
**SOPs:** óxidos de esteroides; *sterol oxidation products*  
**TAME:** *tosyl-2-arginine methyl ester hydrochloride*  
**tBOOH:** *tert-butyl hydroperoxide*  
**TEER:** *transepithelial electrical resistance*  
**TICE:** vía de excreción transintestinal  
**TLR-4:** receptor tipo toll 4; *Toll-like receptor 4*  
**TNBS:** ácido trinitrobenzeno sulfónico; *trinitrobenzene sulfonic acid*  
**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**UC:** *ulcerative colitis*

Resumen

*Abstract*





Las bebidas a base de zumo de frutas y leche son matrices adecuadas para el enriquecimiento con esteroides vegetales (EV) debido a su perfil nutricional saludable y aporte de compuestos antioxidantes ( $\beta$ -criptoxantina ( $\beta$ -Cx), polifenoles y vitamina C). Aunque el efecto más estudiado de los EV es el hipocolesterolemiante, recientes estudios apuntan a que podrían tener beneficios adicionales sobre la defensa frente a estrés oxidativo, procesos inflamatorios a nivel intestinal y sistémico y actividad antiproliferativa en células de cáncer de colon. El enriquecimiento con galactooligosacáridos (GOS) podría ser una estrategia para mejorar la funcionalidad de las bebidas enriquecidas en EV, dado su conocido efecto beneficioso sobre la microbiota intestinal y procesos inflamatorios colónicos, si bien se ha indicado que la adición de fibra soluble puede reducir la bioaccesibilidad de los esteroides en modelos de digestión gastrointestinal simulada.

El objetivo general de la Tesis Doctoral es evaluar la influencia que ejercen los GOS sobre la bioaccesibilidad de los esteroides y los efectos beneficiosos asociados al consumo regular de bebidas a base de zumo de frutas y leche conteniendo EV,  $\beta$ -Cx y GOS con un abordaje triple: *in vitro* (Caco-2), *ex vivo* (eritrocitos humanos) e *in vivo* (*Caenorhabditis elegans* y ratones).

La adición de GOS a bebidas enriquecidas con EV (2,5 g/250 ml) (MfB) a dosis de 2,3 y 4,5 g/250 ml (MfB-G<sub>2</sub> y MfB-G<sub>5</sub>, respectivamente) no afecta a la bioaccesibilidad del colesterol (78-88%) y EV totales (~37%) evaluada tras la aplicación de una digestión gastrointestinal micelar, por lo que se selecciona la bebida con mayor contenido de GOS para posteriores estudios de bioactividad (MfB-G<sub>5</sub>). La aplicación del método estandarizado de digestión Infogest a la bebida sin GOS no permite la cuantificación del colesterol en la fracción bioaccesible y requiere un cambio en el origen de las sales biliares utilizadas (bovinas en lugar de porcinas) o reducir la concentración de sales biliares de origen porcino (10 mM a 1,4 mM).

Los resultados obtenidos en los ensayos de citoprotección en células Caco-2 diferenciadas (modelo de epitelio intestinal) indican que la pre y coincubación con las fracciones bioaccesibles de las bebidas objeto de estudio protegen frente al estrés oxidativo y la apoptosis inducida por óxidos del colesterol (COPs). El efecto citoprotector observado se confirma en el modelo de *C. elegans* en el que las bebidas, además de reducir el estrés oxidativo producido por los COPs y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incrementan la longevidad del nematodo. En general, la bebida con GOS no potencia el efecto citoprotector. En células Caco-2 diferenciadas y en modelo murino con colitis crónica, se constata que la presencia de GOS reduce el efecto beneficioso de las bebidas sobre mediadores proinflamatorios (IL-6, IL-8 y factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)), los síntomas clínicos asociados a la colitis y el daño del tejido colónico.

Los EV de forma individual o como mezcla, a concentraciones colónicas, muestran un efecto antiproliferativo en células Caco-2 no diferenciadas, siendo más efectivos cuando se incuban como mezcla de EV. Así mismo, se observa que los EV a concentraciones séricas, estimadas a partir de la ingesta de una bebida enriquecida en EV y  $\beta$ -Cx, atenúan la activación de procesos eritrotóxicos y previenen completamente la hemólisis en eritrocitos humanos inducida por la  $\beta$ -Cx con y sin estrés oxidativo.

Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de los diferentes modelos utilizados indican que la adición de GOS a las bebidas a base de zumo de fruta y leche enriquecidas en EV no modifican la bioaccesibilidad de los EV. Además, no mejoran los efectos biológicos relativos a citoprotección e inflamación *in vitro* e *in vivo*.

Milk-based fruit beverages are suitable matrices for enrichment with plant sterols (PS) due to their healthy nutritional profile and presence of antioxidant compounds. Although the cholesterol-lowering effect of PS is the most studied, recent studies suggest that PS could have additional benefits on defence against oxidative stress, inflammatory processes and anti-proliferative activity in colon cancer cells. The enrichment with galactooligosaccharides (GOS) could be a strategy to improve the functionality of PS-enriched beverages, given its known beneficial effect on the intestinal microbiota. However, it has been indicated that the addition of soluble fibre can reduce bioaccessibility of sterols in simulated gastrointestinal digestion models.

The aim of the Doctoral Thesis is to evaluate the influence of GOS on the bioaccessibility of sterols and the beneficial effects associated with regular consumption of milk-based fruit beverages containing PS,  $\beta$ -Cx and GOS with triple approach; *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*.

The addition of GOS to PS-enriched beverages (2.5 g / 250 ml) (MfB) at doses of 2.3 and 4.5 g/250 ml (MfB-G<sub>2</sub> and MfB-G<sub>5</sub>, respectively) does not affect the evaluated bioaccessibility of cholesterol (78-88%) and total PS (~ 37%) after micellar gastrointestinal digestion. Therefore, the beverage with the highest GOS content is selected for subsequent bioactivity studies (MfB-G<sub>5</sub>). The application of the standardised digestion method of Infogest to the beverage without GOS does not allow the quantification of cholesterol in the bioaccessible fraction and requires a change in the origin of the bile salts used (bovine instead of porcine) or a reduction in the concentration of porcine bile salts (10 mM to 1.4 mM).

The results obtained from the cytoprotective assays in differentiated Caco-2 cells (intestinal epithelial model) indicate that pre- and co-incubation with the bioaccessible fractions of the beverages tested protects against oxidative stress and apoptosis induced by cholesterol oxidation products (COPs). The cytoprotective effect observed is confirmed in the *C. elegans* model in which beverages, in addition to reducing the oxidative stress produced by COPs and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, increase the longevity of the nematode. In general, the beverage with GOS does not enhance the cytoprotective effect. In differentiated Caco-2 cells and in the murine model with chronic colitis, the presence of GOS reduces the beneficial effect of beverages on pro-inflammatory mediators, as well as the clinical symptoms associated with colitis and colonic tissue damage.

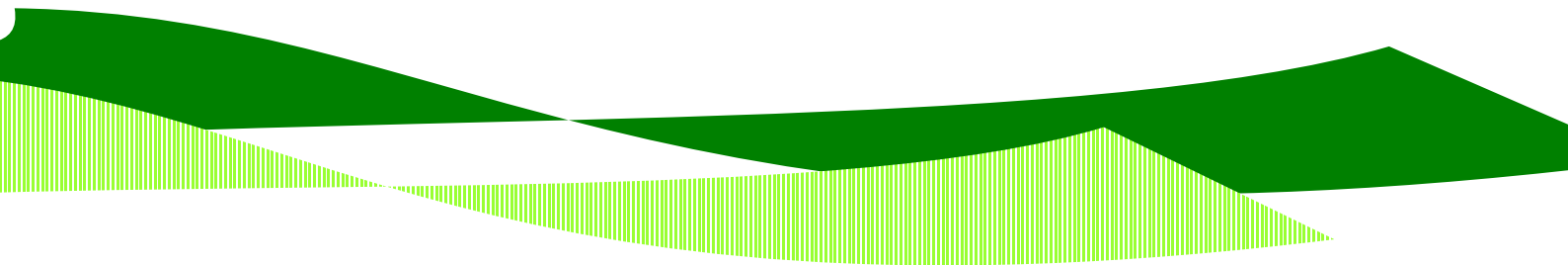
Individual or mixed PS, at colonic concentrations, show an anti-proliferative effect on undifferentiated Caco-2 cells, being more effective when incubated as a PS mixture. Likewise, PS at serum concentrations, attenuate the activation of eryptotic processes and completely prevent haemolysis in human erythrocytes induced by  $\beta$ -Cx with and without oxidative stress.

Therefore, the results obtained from the different models indicate that the addition of GOS to PS-enriched milk-based fruit beverages does not modify the bioaccessibility of PS. In addition, they do not improve the biological effects related to cytoprotection and inflammation *in vitro* and *in vivo*.



Objetivos

*Objectives*





El objetivo general es evaluar la influencia que ejercen los GOS sobre la bioaccesibilidad de los esteroides y los efectos beneficiosos asociados al consumo regular de bebidas que contienen EV,  $\beta$ -Cx y GOS con un abordaje triple: *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Los objetivos específicos son:

**Objetivo 1:** Evaluar la influencia de la adición de GOS a bebidas a base de zumo de frutas y leche enriquecidas en EV sobre la bioaccesibilidad de los esteroides mediante métodos de digestión gastrointestinal simulada estática.

**Objetivo 2:** Estudiar el efecto citoprotector y antiinflamatorio de las fracciones bioaccesibles y las bebidas objeto de estudio en modelos de cultivo celular (Caco-2 diferenciadas) y animales (*C. elegans* y ratones), respectivamente.

**Objetivo 3:** Evaluar el efecto antiproliferativo de los EV a concentraciones colónicas en células de cáncer de colon humano (Caco-2 no diferenciadas).

**Objetivo 4:** Estimar el efecto pro o antieritrocítico de los EV y/o  $\beta$ -Cx a concentraciones plasmáticas en eritrocitos humanos (modelo *ex vivo*).

The general objective is to evaluate the influence of GOS on the bioaccessibility of sterols and the beneficial effects associated with regular consumption of beverages containing PS,  $\beta$ -Cx and GOS with a triple approach; *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*.

The specific objectives are:

**Objective 1:** To evaluate the influence of the addition of GOS to PS-enriched milk-based fruit beverages on the bioaccessibility of sterols using static simulated gastrointestinal digestion methods.

**Objective 2:** To study the cytoprotective and anti-inflammatory effects of bioaccessible fractions and beverages studied in cell culture (Caco-2 differentiated) and animal models (*C. elegans* and mice), respectively.

**Objective 3:** To evaluate the anti-proliferative effect of PS at colonic concentrations in human colon cancer cells (Caco-2 undifferentiated).

**Objective 4:** Estimate the pro- or anti-eryptotic effect of PS and/or  $\beta$ -Cx at plasma concentrations in human erythrocytes (*ex vivo* model).

Antecedentes bibliográficos

*Literature review*





## 1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares, el cáncer o las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son algunas de las patologías crónicas con mayor mortalidad y/o morbilidad del mundo actual. A pesar de los grandes avances logrados en su tratamiento y prevención, la incidencia crece anualmente en los países desarrollados como consecuencia del aumento de la obesidad, diabetes tipo 2, factores ambientales, dietéticos y del estilo de vida (hábito de fumar, sedentarismo, consumo de alcohol, etc.) (Arends et al., 2017; Wu et al., 2017), entre otros factores. La falta de un tratamiento farmacológico efectivo para estas enfermedades ha dado lugar al estudio de terapias complementarias orientadas a paliar los síntomas o ayudar a prevenir su aparición, tal como el uso de alimentos funcionales. Éstos se definen como: “ alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos conocidos o desconocidos que, en cantidades definidas, efectivas y no tóxicas, proporcionan un beneficio clínicamente probado y documentado para la prevención, control o tratamiento de enfermedades crónicas (Martirosyan & Singh, 2015).

El enriquecimiento de alimentos con compuestos bioactivos es una forma muy común para el diseño de alimentos funcionales y se consideran su fuente de efectividad (Granado-Lorencio & Hernández-Alvarez, 2016). Los esteroides vegetales (EV) son compuestos bioactivos de origen vegetal cuya función más estudiada sobre el organismo humano es su efecto hipocolesterolemiante. Sin embargo, existen cada vez más evidencias que apuntan a que podrían ejercer una acción beneficiosa a nivel colónico reduciendo la inflamación local y sistémica, y ayudando a la prevención del cáncer colorrectal (Plat et al., 2019). Por otro lado, los galactooligosacáridos (GOS) son polisacáridos fermentables por la microbiota intestinal con efectos positivos sobre el crecimiento de bacterias beneficiosas como las bifidobacterias y lactobacilos. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por dichas bacterias ayudan al mantenimiento del epitelio colónico y reducen el proceso inflamatorio (Lamsal, 2012; Slavin, 2013). Sin embargo, la mayor parte de los estudios que evalúan los efectos biológicos de los EV y GOS utilizan los compuestos de forma aislada o como complementos alimenticios, por lo que se desconoce su efecto real en el contexto de una matriz alimentaria o dieta.

Las bebidas a base de zumo de frutas y leche son una matriz de interés para el enriquecimiento con compuestos bioactivos, debido al contenido en compuestos potencialmente beneficiosos (fibra, minerales, vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos) y a que presentan un perfil de alimento saludable (restricción de ácidos grasos saturados, azúcares, colesterol y valor energético). Además, trabajos previos del grupo de investigación han demostrado que son una matriz adecuada para proporcionar la cantidad diaria recomendada de EV (1,5-3 g/día) en sujetos con hipercolesterolemia

moderada, así como incorporar otros ingredientes o compuestos con actividad biológica ( $\beta$ -criptoxantina ( $\beta$ -Cx) y membrana del glóbulo graso de leche) (Alvarez-Sala et al., 2018a)

## 2. Esteroles vegetales

### 2.1 Estructura química y fuentes dietéticas

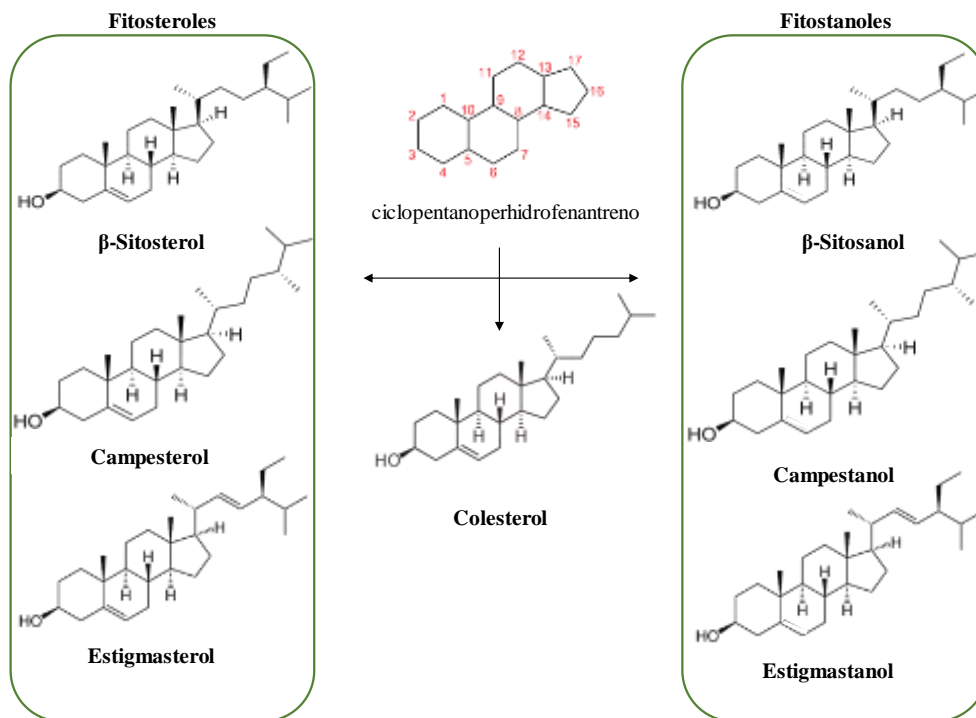
Los EV son compuestos lipofílicos presentes en alimentos de origen vegetal con una base estructural denominada ciclopentanoperhidrofenantreno y una cadena lateral en posición C-17 de 8-10 átomos de carbono (Gylling & Simonen, 2016) (ver figura 1). En función de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos C-5 y C-6 se les denomina fitosteroles y fitostanoles, respectivamente. Las diferencias químicas de los EV, con respecto al colesterol (esterol mayoritario en alimentos de origen animal), residen en la cadena lateral. Los EV contienen un grupo metilo o etilo extra en posición C-24, o bien insaturaciones a lo largo de la cadena lateral (Moreau et al., 2018). Se han descrito en la actualidad más de 200 tipos de EV en la naturaleza, siendo los fitosteroles mayoritarios  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol y fitostanoles sitostanol y campestanol (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). Los EV pueden estar presentes en los alimentos en forma libre o esterificados con ácidos grasos o ácido hidroxicinámico a través del grupo hidroxilo situado en el carbono C-3, así como glicosilados con pequeñas moléculas de azúcar (Lagarda et al., 2006).

La principal fuente dietética de EV son los aceites vegetales (maíz, girasol, soja y oliva) con un contenido que oscila entre 93-950 mg/100 g, seguido de frutos secos (131-242 mg/100 g) (Normén et al., 2007; Bacchetti et al., 2011), cereales (61-100 mg/100 g) (Normén et al., 2002), legumbres (35-121 mg/100 g) (Bacchetti et al., 2011) y frutas y hortalizas (0.6-16 mg/100 g) (Piironen et al., 2003; Martins et al., 2013). La ingesta diaria media de EV en dietas occidentales oscila entre 211-325 mg/día, alcanzando hasta 600 mg/día en dietas vegetarianas (García-Llatas et al., 2015; López et al., 2016). En España, la ingesta de EV se sitúa en 276 mg/día, siendo los aceites vegetales y cereales los que más contribuyen a la ingesta total (70%) (Jiménez-Escrig et al., 2006). En el caso particular de la Comunidad Valenciana, un estudio realizado durante los años 2005 y 2013-2014 estima que la ingesta de EV media es de 282 y 274 mg/día, respectivamente, lo que está en consonancia con lo observado en España y Europa. Los alimentos que más contribuyen a la ingesta de EV en la población valenciana son las legumbres (30-35 %) y hortalizas (~20%), seguido por frutas (11-18 %) y aceites vegetales (7-16 %) (García-Llatas et al., 2015).



Los EV están sujetos a declaraciones de propiedades de salud, definidas como cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud (Reglamento 1924/2006/UE). Los EV tienen autorizada por la UE una declaración relativa a la reducción de riesgo de enfermedad en la que se indica que el efecto beneficioso de los EV sobre la reducción del colesterol sanguíneo se alcanza con una ingesta de 1,5-3 g/día (Reglamentos 384/2010/UE y 983/2009/UE). En posteriores modificaciones (Reglamento 686/2014/UE), se establece que se podrá incluir la magnitud del efecto hipocolesterolemiante (en forma de porcentaje) en la declaración, si bien es necesario tener en cuenta una serie de premisas. Está restringida a alimentos incluidos en las siguientes categorías: grasas amarillas para untar, productos lácteos, mayonesa y aliños para ensalada. Se debe comunicar al consumidor que los alimentos que aporten una ingesta diaria de 1,5 a 2,4 g o de 2,5 a 3 g de fitosteroles/fitostanoles reducen el colesterol plasmático “del 7 al 10 %” y “del 10 al 12,5 %”, respectivamente.

**Figura 1.** Estructura química de los esteroides dietéticos mayoritarios



Además, se debe incluir el periodo a partir del cual se obtiene el efecto, mediante la siguiente afirmación “de dos a tres semanas”. Finalmente, los EV tienen una segunda declaración de propiedades de salud, enmarcada dentro de las distintas a reducción de riesgo de enfermedad y salud de los niños, que indica que la ingesta diaria mínima de 0,8 g de fitosteroles/fitostanoles contribuyen a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo (Reglamento 432/2012/UE). Destacar, que esta

última declaración tiene como población diana adultos sanos, mientras que la primera adultos con moderada hipercolesterolemia.

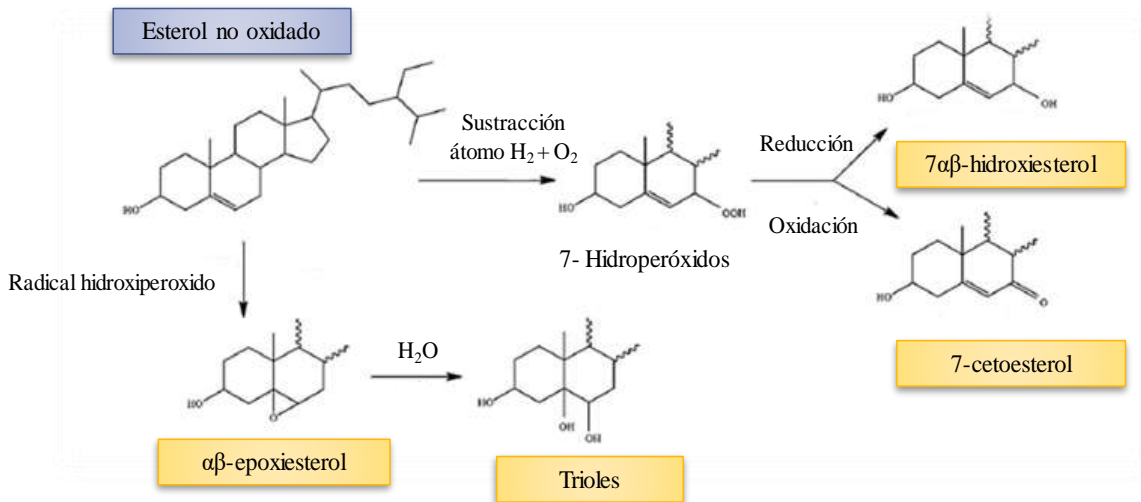
Para alcanzar la dosis de EV recomendadas (1,5-3 g/día) no es suficiente el aporte a través de la dieta, por ello es necesario el enriquecimiento de alimentos con EV. Inicialmente, se enriquecen con EV las grasas amarillas para untar (margarinas), debido a la facilidad para solubilizarlos e incorporar el alimento a la dieta habitual de la población (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). Sin embargo, la creciente preocupación de los consumidores por alimentos más saludables y la mejora de la solubilidad de los EV (reducción del tamaño de partícula, estabilizantes o microencapsulación) en alimentos con un mayor contenido de agua, ha llevado a una amplia diversificación de alimentos enriquecidos. En la actualidad existen diversas matrices autorizadas por la UE para incorporar EV, entre las que destacan leches fermentadas (tipo yogur) (Decisiones 2004/334/CE y 2004/335/CE), bebidas con base láctea semidesnatada o desnatada (Decisión 2004/845/CE) o a base de cereales y soja (Decisión 2004/333/CE), arroz (Decisión 2008/36/CE), bebidas de fruta a base de leche (Decisión 2004/336/CE) y pan de centeno (Decisiones 2006/58/CE y 2006/59/CE). Como se ha comentado anteriormente, las bebidas de fruta a base de leche enriquecidas en EV son una buena alternativa a alimentos ricos en grasa, por adecuarse a las recomendaciones de salud y contener otros compuestos bioactivos procedentes de las frutas (vitaminas y carotenoides) (Cilla et al., 2019). Además, la posibilidad de ser consumido en forma de dosis unitarias fácilmente transportables los convierte en alimentos de conveniencia (Cusack et al., 2013).

## 2.1 Óxidos de esteroides

Los esteroides son susceptibles de oxidarse por su estructura insaturada, dando lugar a los óxidos de esteroides o SOPs (*Sterol Oxidation Products*), denominados COPs (*Cholesterol Oxidation Products*) si derivan del colesterol o POPs (*Phytosterol Oxidation Products*) si lo hacen a partir de los EV. La vía más común de formación de los SOPs en alimentos es la autooxidativa, que se inicia con la sustracción del átomo hidrógeno contiguo al doble enlace C5-C6 del anillo esteroideo, seguido de una reacción con especies radicales del oxígeno (oxígeno triplete, radical hidroperóxido, catión dióxígeno) para dar lugar a 7-hidroperóxidos altamente reactivos, que derivan en productos más estables como los 7 $\alpha$  $\beta$ -hidroxiesteroides y 7-cetoesteroides a través de reacciones de reducción u oxidación, respectivamente (ver figura 2) (Maldonado-Pereira et al., 2018). Otros SOPs producidos por la vía autooxidativa son los epóxidos y trioles. La formación de epóxidos (isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ ) ocurre

por unión de un radical hidropéroxido y un esteroles no oxidado a temperaturas elevadas, mientras que los trioles se forman a partir de la hidratación de moléculas de  $\alpha,\beta$ -epoxiesteroles en medio ácido (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011).

**Figura 2.** Mecanismo de autooxidación de los esteroides en alimentos



Adaptada de García-Llatas & Rodríguez-Estrada. (2011)

El contenido de SOPs en alimentos depende directamente de la composición de los mismos, el proceso industrial y culinario que sufren y de las condiciones de almacenamiento. El control de factores como la temperatura, la exposición a la luz y oxígeno así como agentes prooxidantes (iones metálicos o hidropéroxidos derivados de ácidos grasos) son clave en la formación de estos compuestos (Barriuso et al., 2017). La ingesta dietética de COPs se ha estimado en 3 mg/día, teniendo en cuenta que la ingesta media de colesterol en la dieta es de 300 mg/día y que los COPs suponen alrededor del 1% del total de colesterol presente en alimentos (Brzeska et al., 2016). La estimación de la ingesta dietética de POPs es difícil, debido a la escasa información sobre su contenido en los alimentos y la incorporación de alimentos enriquecidos en EV en la dieta de la población. Scholz et al. (2015) estiman la ingesta de POPs, considerando un consumo de 3g/día de EV, en 3 mg POPs/día para alimentos no tratados térmicamente y 30 mg POPs/día para los que sufren tratamiento térmico.

El efecto de SOPs, y en particular de los COPs, sobre la salud humana ha cobrado importancia en las últimas décadas debido a su potencial papel en el desarrollo de la aterosclerosis, donde el efecto de los COPs ha sido más estudiado. Aunque se desconoce el mecanismo exacto, se ha demostrado que los COPs pueden incorporarse en las bicapas lipídicas produciendo la alteración de la homeostasis de iones (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>), alteración del plegamiento de proteínas, activación de enzimas prooxidantes (NADPH oxidasa), y finalmente apoptosis celular. La disfunción de las células del endotelio vascular

se considera el proceso inicial para el desarrollo de la lesión aterosclerótica, donde participan además otros elementos como células inmunológicas y mediadores inflamatorios (Testa et al., 2018). Además, se ha sugerido que los COPs podrían inducir la muerte celular de los eritocitos y favorecer su adhesión al endotelio vascular, promoviendo el proceso aterosclerótico (Tesoriere et al., 2014). Este último aspecto se desarrollará más adelante (apartado 6.5).

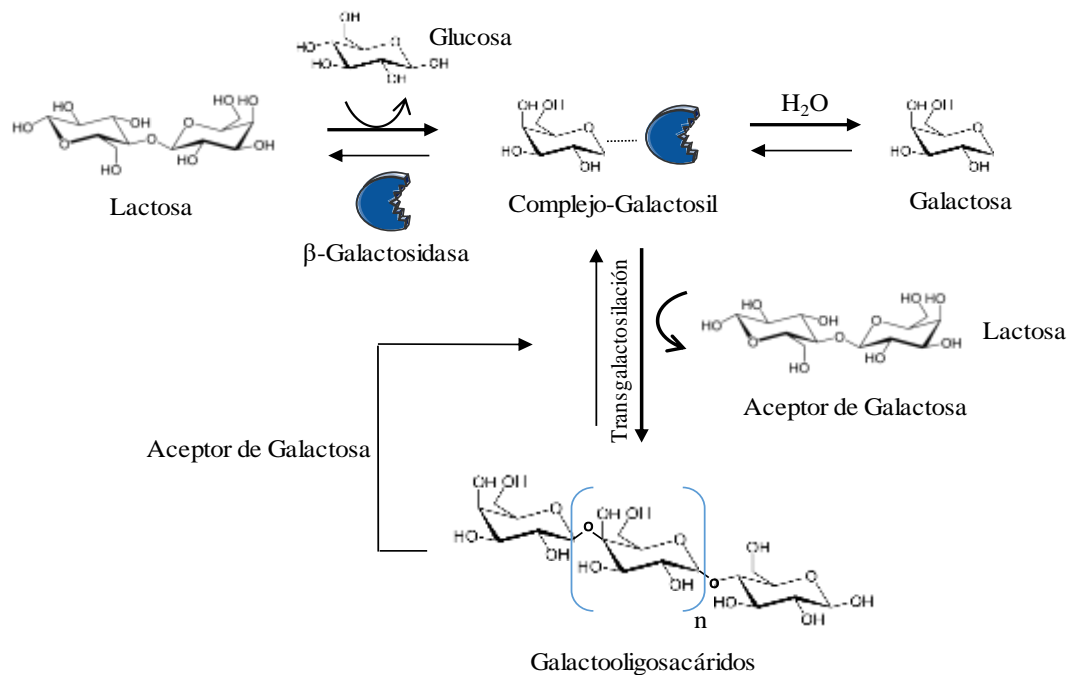
Otro efecto ampliamente estudiado de los SOPs es su papel en el desarrollo de las EII. Se ha indicado que el 7-cetocolesterol y 7 $\beta$ -hidroxicolesterol son potentes inductores de estrés oxidativo y favorecen la síntesis de mediadores proinflamatorios en diferentes modelos *in vitro* (células intestinales o inmunológicas) e *in vivo* (roedores y *Caenorhabditis elegans*) (Vejud et al., 2019). En células de epitelio intestinal (Caco-2 diferenciadas) el tratamiento con COPs a concentraciones compatibles con la dieta (30-150  $\mu$ M) produce: (i) alteraciones en el balance redox intracelular a través de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y depleción de glutatión reducido (GSH); (ii) muerte celular a través de procesos apoptóticos y necróticos (Biasi et al., 2013) (iii) disrupción de la barrera del epitelio intestinal (monocapa celular) (Deiana et al., 2017); y (iv) alteraciones en el ciclo celular (Alemany et al., 2012). Por lo tanto, la exposición continuada a los COPs ayudaría a desestabilizar la función barrera intestinal, que junto a la inducción de la activación de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8), contribuiría a la aparición de las EII. En cuanto a los POPs, su efecto ha sido menos estudiado como consecuencia de la escasa disponibilidad de patrones comerciales y su elevado coste económico. Sin embargo, el mecanismo de acción parece ser muy similar al de los COPs, aunque se requieren dosis de 2 a 4 veces más altas para producir un efecto equivalente (Vanmierlo et al., 2013).

Los compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias podrían ejercer una atenuación del daño en el epitelio intestinal inducido por estrés oxidativo. Dos revisiones recientes indican que el tratamiento con extractos naturales o compuestos dietéticos como polifenoles, carotenoides y vitaminas antioxidantes contrarrestan total o parcialmente los efectos citotóxicos y proinflamatorios de los COPs en modelos *in vitro* con células intestinales (Caco-2 diferenciadas), endoteliales (HAEC, HUVEC, etc.) y neuronales (PC12 y SH-SY5Y) (Cilla et al., 2017; Brahmi et al., 2019). En este contexto, se ha propuesto el uso de una mezcla de COPs conteniendo los óxidos mayoritarios presentes en alimentos ricos en colesterol sometidos a un procesamiento térmico a concentraciones dietéticas (30-120  $\mu$ M), como modelo de estrés oxidativo en células Caco-2 diferenciadas (Biasi et al., 2009). La finalidad de este modelo sería la de evaluar las propiedades beneficiosas de los alimentos, compuestos bioactivos, extractos naturales y otros componentes bajo un entorno oxidativo más cercano a las condiciones fisiológicas.

### 3. Galactooligosacáridos

Los GOS son oligosacáridos no digeribles formados por un número variable de monómeros de galactosa (de 2 a 5) y una glucosa en el extremo terminal, unidos mediante diferentes enlaces o-glicosídicos  $\beta$  1-4,  $\beta$  1-6,  $\alpha$  1-4, entre otros. Los GOS se sintetizan a nivel industrial principalmente a partir de lactosa, por reacciones de transgalactosilación catalizadas por la  $\beta$ -galactosidasa (Sangwan et al., 2011) (ver figura 3). Dependiendo del origen de la  $\beta$ -galactosidasa (fúngica o microbiana) y las condiciones de la reacción enzimática, la composición química y el rendimiento de síntesis de los GOS varía en gran medida. El tipo de enlace o-glicosídico presente en los GOS depende directamente del origen de la enzima, por ejemplo la  $\beta$ -galactosidasa procedente de *Bacillus circulans* o *Cryptococcus laurentii* une los diferentes monómeros de galactosa a través de un enlace  $\beta$  1-4, mientras que *Aspergillus oryzae* o *Streptococcus thermophilus* mediante un enlace  $\beta$  1-6 (Lamsal, 2012). El grado de polimerización (GP) viene determinado principalmente por la concentración inicial de lactosa en la reacción; altos contenidos permiten la utilización de lactosa, además de como sustrato, como aceptor de galactosa, dando lugar a GP altos (tri-, tetra- y oligosacáridos), mientras que concentraciones bajas de lactosa se traduce en peores rendimientos y obtención de GOS de bajo GP. Otros factores como la temperatura y el tiempo de actuación de la enzima también afectan al GP (Osman, 2015).

**Figura 3.** Formación enzimática de galactooligosacáridos a partir de lactosa



Los GOS se comercializan como ingredientes para la industria alimentaria en forma de mezclas de diferentes oligosacáridos de GP variable, conteniendo además residuos de lactosa y monómeros de azúcares como galactosa y glucosa. En general, la pureza de los GOS oscila entre 48-70 % (p/p) dependiendo de la casa comercial, si bien existen en la actualidad empresas que permiten obtener purezas de hasta un 90-92 % (p/p). Además de la variabilidad en la pureza, los ingredientes comerciales se diferencian en el tipo de enlace o-glicosídico de la cadena de azúcares. Vivinal®GOS o Purimune ofrecen ingredientes con GOS con enlace  $\beta$  1-4, mientras que en Bimuno®GOS o Oligomate son mayoritariamente  $\beta$  1-3 y  $\beta$  1-6, respectivamente (Lamsal, 2012). Un aspecto importante a destacar de los GOS son las propiedades tecnológicas, las cuales los convierte en un ingrediente versátil y con un gran potencial en el diseño de alimentos funcionales. Los GOS, a diferencia de otros oligosacáridos como la inulina, son altamente solubles en agua y su adición a los alimentos no produce cambios de color, viscosidad y sabor. Además, la presencia de enlaces tipo  $\beta$ , les confiere una gran estabilidad a la temperatura y al medio ácido, permaneciendo inalterados a temperaturas por encima de 120 °C a pH 7 y estables a pH 2 durante meses a temperatura ambiente. Sus propiedades tecnológicas permiten su adición a matrices con un alto contenido de agua como leche y sopas, así como alimentos ácidos como zumos de fruta y leches fermentadas (Sangwan et al., 2011).

#### 4. Metabolismo

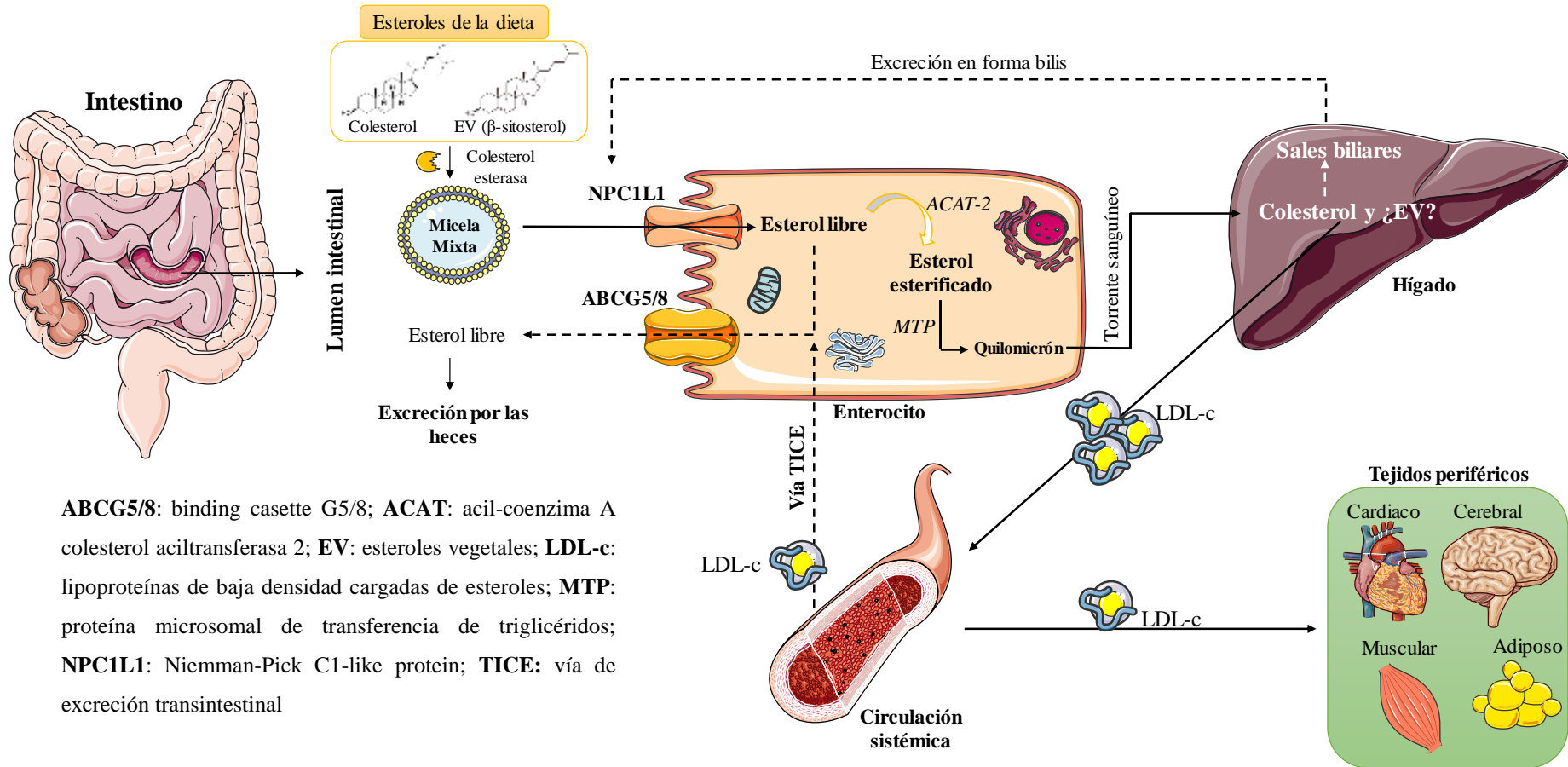
##### 4.1 Esteroles

Alrededor del 50 % del colesterol dietético es absorbido a nivel intestinal, aunque presenta una gran variabilidad interindividual (20-80 %). En cambio, los EV son absorbidos de forma menos eficiente, fitosteroles entre 0.5-2 % y fístanoles 0.04-0.2%. El metabolismo de los esteroles (colesterol y EV) se inicia en el intestino delgado, donde la enzima carboxil éster lipasa pancreática (colesterol esterasa) hidroliza los esteroles esterificados dando lugar a esteroles libres y monoacilglicéridos. Los esteroles libres son incorporados a micelas mixtas compuestas por moléculas anfipáticas (ácidos biliares, monoglicéridos, fosfolípidos, etc.), que emulsionan la grasa y facilitan el transporte de compuestos pocos solubles en agua hacia la superficie de los enterocitos (de Boer et al., 2018) (ver figura 4). La absorción de esteroles se realiza principalmente por difusión facilitada, a través de los transportadores Niemann-Pick C1-like protein 1 (NPC1L1) localizados en el borde en cepillo (mayor afinidad por el colesterol que por los EV), aunque una pequeña parte se absorbe por difusión pasiva (Trautwein et al., 2003; Ikeda, 2015). En el interior del enterocito, una parte de los

esteroles se re-esterifica por acción de la enzima acil-coenzima A colesterol aciltransferasa 2 (ACAT-2), la cual presenta una mayor afinidad por el colesterol. Una vez re-esterificados, los esteroles son incorporados a los quilomicrones nacientes con la ayuda de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos y se liberan al sistema linfático a través de la membrana basolateral del enterocito (Gylling & Simonen, 2015; Olkkonen et al., 2017). Los quilomicrones con los esteroles esterificados pasan al torrente sanguíneo y son captados por el hígado, principal órgano regulador de la homeostasis del colesterol. Dependiendo de las necesidades de los diferentes tejidos periféricos, el hígado libera colesterol al torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas, siendo las lipoproteínas de baja densidad (LDL) las que transportan el mayor contenido de esteroles a los tejidos (65-70 %) (Gylling et al., 2014).

El colesterol y los EV son excretados principalmente a través de la bilis. Una parte del colesterol procedente de la dieta o del sintetizado en el organismo, es transformado en el hígado en ácidos biliares mediante reacciones consecutivas de hidroxilación seguido de una conjugación con glicina o taurina, dando lugar a los ácidos cólicos y deoxicólicos. El colesterol libre y los ácidos biliares formados a partir del mismo, se incorporan a la bilis y son excretados al lumen intestinal durante la digestión. En humanos no se ha demostrado que los EV sean utilizados para la síntesis de sales biliares, aunque se ha detectado la presencia de los mismos en extractos biliares (Trautwein et al., 2003). Además de la vía biliar, recientemente se ha descrito una nueva vía de excreción de esteroles conocida como vía de excreción transintestinal (TICE) (ver figura 4). Se caracteriza por la captación activa del colesterol presente en el torrente sanguíneo y su posterior secreción al lumen intestinal a través de los transportadores Casete de unión Adenosina Trifosfato (ABC: ABCG5 y ABCG8) localizados en el borde en cepillo los enterocitos (Jakulj et al., 2016). Estos transportadores también participan en la secreción al lumen intestinal de esteroles dietéticos no esterificados por la ACAT-2 (principalmente EV) durante el proceso de absorción (Gylling et al., 2014). Se ha estimado del total de esteroles excretados por adultos sanos, que el 11 % corresponde a esteroles no absorbidos, mientras que el 22 y 66 % a aquellos excretados por la vía TICE y biliar respectivamente (Jakulj et al., 2016; Grefhorst et al., 2019).

**Figura 4.** Metabolismo de los esteroides



**ABC5/8:** binding cassette G5/8; **ACAT:** acil-coenzima A colesterol aciltransferasa 2; **EV:** esteroides vegetales; **LDL-c:** lipoproteínas de baja densidad cargadas de esteroides; **MTP:** proteína microsomal de transferencia de triglicéridos; **NPC1L1:** Nieman-Pick C1-like protein; **TICE:** vía de excreción transintestinal

Adaptada de Cuevas-Tena et al. (2018)



## 4.2 Galactooligosacáridos

Alrededor del 90 % de los GOS ingeridos resisten la digestión gastrointestinal superior (Loo et al., 1999). Su digestibilidad varía en función del GP y el tipo de enlace o-glicosídico. En este sentido, Chonan et al. (2004) indican que los GOS con GP 3 y 4 no son hidrolizados por la acción de la  $\alpha$ -amilasa salivar humana, así como por fluidos gástricos simulados y extractos intestinales de ratón, mientras que los de GP 2, son hidrolizados parcialmente por acción de las enzimas intestinales. En cambio, en un estudio *in vivo* en ratas alimentadas con GOS al 1% (p/p), se observa una alta metabolización de los GOS con GP 3 (~ 52%), como resultado de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa presente en el borde en cepillo de las células intestinales. Los autores además sugieren que las uniones galactosa-glucosa  $\beta$  1-2 y  $\beta$  1-6 son más resistentes a la digestión gastrointestinal que los enlaces  $\beta$  1-4 (Hernández-Hernández et al., 2012). Ello pone de manifiesto la importancia de la caracterización del ingrediente de GOS a utilizar, así como la incorporación de la  $\beta$ -galactosidasa en modelos de digestión *in vitro*.

Tras alcanzar el colon, los GOS son susceptibles de ser fermentados por las bacterias intestinales con actividad  $\beta$ -galactosidasa, modulando así la composición de la microbiota. Estudios clínicos con individuos sanos han demostrado que la ingesta de 2,5-10 g/día de GOS incrementa la población de bacterias beneficiosas del género *Bifidobacterium sp.*, y en menor medida *Lactobacillus sp* (Depeint et al., 2008; Vulevic et al., 2015; Liu et al., 2017; Krumbeck et al., 2018). La magnitud del efecto bifidogénico de los GOS es controvertido debido a la escasa dosis-respuesta que presentan y a la dependencia del contenido inicial de bifidobacterias (Bouhnik et al., 2004; Davis et al., 2011). El consumo de GOS en individuos con contenidos basales relativamente altos de bifidobacterias en colon presentan un limitado efecto bifidogénico, sugiriendo la existencia de un umbral a partir del cual el contenido total de bifidobacterias permanece constante (Whisner et al., 2013). Se ha indicado que los prebióticos con un GP bajo o medio (<10) son rápidamente fermentados por la microbiota, especialmente el género *Bifidobacterium sp.*, mientras que aquellos con GP entre 10-60 muestran bajos ratios de fermentación y producción de AGCC (Hernot et al., 2009).

## 5. Bioaccesibilidad

Además del contenido de compuestos bioactivos en los alimentos es necesario conocer su bioaccesibilidad y bioactividad (Rein et al., 2013). La bioaccesibilidad se define como aquella fracción de un nutriente/compuesto bioactivo que se libera de la matriz alimentaria y permanece

disponible para su absorción intestinal y subsecuente incorporación al sistema circulatorio. En cambio, la bioactividad abarca aquellos procesos que permiten que el nutriente/compuesto bioactivo alcance la diana de acción y sea metabolizado o biotransformado de modo que ejerza una respuesta fisiológica sobre el organismo. La unión de ambos conceptos es lo que se conoce como biodisponibilidad (Guerra et al., 2012). Aunque los estudios de intervención clínica en humanos constituyen los métodos de referencia para estimar la biodisponibilidad, el alto coste del equipamiento y del personal cualificado, unido a las limitaciones del diseño experimental, las restricciones éticas y la alta variabilidad interindividual, han llevado al desarrollo de métodos alternativos como los modelos *in vitro* de digestión simulada (Alegría et al., 2015).

Los métodos *in vitro* tratan de simular las condiciones de la digestión gastrointestinal humana (temperatura, pH, agitación y composición de enzimas, y otros componentes) y generalmente constan de una etapa salivar, gástrica e intestinal. La etapa salivar se aplica normalmente si el alimento es sólido y contiene almidón, el cual se hidroliza parcialmente por la  $\alpha$ -amilasa salivar a pH neutro (6,5-7,5). La etapa gástrica se realiza con adición de HCl y/o pepsina a un pH variable de entre 1-2 (1-3h), mientras que en la etapa intestinal se recupera el pH neutro (6,5-7,5, 1-5h) y se adicionan pancreatina o enzimas individuales, así como sales biliares que ayuden a la digestión lipídica (Cilla et al., 2018a). Estos métodos permiten estimar la bioaccesibilidad mediante la determinación de la cantidad de compuesto soluble presente en el sobrenadante (fracción bioaccesible), obtenido por centrifugación o filtración del digerido gastrointestinal, con respecto al contenido total presente en el alimento. Aunque no incluye procesos como la absorción intestinal, permiten comparar la solubilidad de un componente en diferentes matrices alimentarias, proporcionando información valiosa para el diseño de nuevas formulaciones y la selección de alimentos con mejor valor nutricional. Estos métodos son ampliamente utilizados para la evaluación del impacto de la digestión sobre el compuesto de interés y las posibles interacciones entre los diferentes compuestos presentes en el alimento, así como en estudios donde se pretenda conocer el efecto positivo o negativo del procesado de alimento (tratamiento térmico, altas presiones, etc.) o modificaciones de la estructura alimentaria (tamaño de partícula, reología, adición de emulsificantes) (Alegría et al., 2015).

### 5.1 Bioaccesibilidad de esteroides vegetales

Son escasos los trabajos relativos a la evaluación de la bioaccesibilidad de EV en alimentos, siendo las bebidas a base de zumo de frutas y leche enriquecidas con EV las más estudiadas (Alemany et al., 2013; Alvarez-Sala et al., 2016). Trabajos previos del grupo de investigación han evaluado la influencia de cambios en la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad de los esteroides (colesterol y

EV) en bebidas a base de zumo de frutas y leche. Para ello, se aplica un método de digestión *in vitro* micelar adaptado a compuestos lipofílicos, en el cual se adicionan (durante la etapa intestinal) enzimas involucradas en el metabolismo lipídico como la lipasa pancreática, colipasa, colesterol esterasa y fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), así como taurocolato sódico para favorecer la micelarización, de modo que se asemeje a las condiciones fisiológicas humanas (Granado-Lorencio et al., 2007). Se ha demostrado que la adición de leche a bebidas de frutas enriquecidas en EV (0,8 g/100mL), tiene un impacto positivo sobre la bioaccesibilidad de los EV totales (4,4-6,5 % vs. 3,1 %) e individuales (6,0-8,3 vs. 2,9-4,8 %). La presencia de grasa láctea podría favorecer la extracción y estabilización de los EV de la matriz alimentaria, mejorando así su dispersión en la fase acuosa de la digestión gastrointestinal. Paralelamente, la incorporación de un concentrado de mandarina rico en carotenoides (principalmente  $\beta$ -Cx) a bebidas con base láctea y zumo de frutas reduce ligeramente la bioaccesibilidad total de los EV (6,5 vs. 4,4 %), probablemente debido a la competición entre los esteroides y la  $\beta$ -Cx por la incorporación a las micelas mixtas. Sin embargo, cabe destacar que la presencia de zumo de frutas y concentrado de mandarina previene parcialmente de la oxidación de los EV y posterior formación de POPs, mostrando una tasa de oxidación un 30 % inferior que la bebida láctea enriquecida solo con EV (Alemany et al., 2013). Además, el aporte de antioxidantes naturales como polifenoles y carotenoides, así como su mayor capacidad antioxidante total, podría aportar un efecto beneficioso adicional más allá del efecto hipocolesterolemiante de los EV (González-Larena et al., 2012). En un estudio posterior se evalúa el efecto de la adición de grasa láctea y concentrado de proteínas séricas enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGM) (origen animal) o aceite de oliva virgen extra y lecitina de soja (origen vegetal), a las bebidas a base de leche enriquecidas en EV y concentrado de mandarina sobre la bioaccesibilidad de los EV. Las bebidas adicionadas con grasa, independientemente de su origen, muestran una bioaccesibilidad total de EV muy superior a la bebida sin grasa añadida (31-28 % vs. 8,7 %), indicando que el contenido de grasa total y la presencia de emulgentes son factores determinantes en la bioaccesibilidad de los EV. El efecto del origen de la grasa y el tipo de emulgente tiene un efecto limitado, aunque la bebida con grasa láctea y MFGM favorece en mayor medida la micelarización de algunos EV como campesterol y estigmasterol (Alvarez-Sala et al., 2016).

El enriquecimiento de alimentos con fibra dietética, y en particular con prebióticos como la inulina, los fructooligosacáridos (FOS) y GOS, se ha convertido en una práctica habitual en la industria alimentaria debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud y funcionalidad del sistema digestivo (Granado-Lorencio & Hernández-Alvarez, 2016). Sin embargo, se ha indicado que la fibra soluble puede influir en la digestión lipídica, envolviendo las partículas de grasa a modo de superficies no permeables que evitan la difusión de enzimas y de compuestos lipofílicos (carotenoides, vitaminas

liposolubles y esteroides) hacia el epitelio intestinal (McClements & Li, 2010; Slavin, 2013). El impacto de la incorporación de fibra dietética sobre el colesterol ha sido ampliamente estudiado. En modelos *in vitro* en tubos de ensayo, se ha descrito que la fibra dietética procedente de la soja (Liu et al., 2016a), el cacao (Nsor-Atindana et al., 2012), el bambú (Luo et al., 2017) o el té (Guo et al., 2016) tienen la capacidad de adsorber el colesterol, reteniendo alrededor de 2-10 o 5-20 mg de colesterol/g de fibra a pH 2 y 7, respectivamente. Los pH simularían las condiciones gástrica e intestinal, siendo ésta última donde potencialmente mayores interacciones fibra-colesterol tendrían lugar. Además, estudios con subfracciones de fibra dietética (soluble, insoluble y total) muestran que la fibra soluble retiene más eficientemente el colesterol que la insoluble (Nsor-Atindana et al., 2012; Luo et al., 2017). Sin embargo, en modelos de digestión gastrointestinal *in vitro*, el efecto de la fibra dietética sobre la bioaccesibilidad del colesterol es más controvertido. Algunos autores han indicado que la adición de extractos de fibra procedente de frutas y tubérculos a empanadas de cerdo (10 %, p/p) (López-Marcos et al., 2015), de higo chumbo (*Opuntia ficus-indica*) a pasta (10-30 %, v/p) (Attanzio et al., 2019) o fibra soluble purificada (goma guar) a yogurt líquido (3 y 6%, p/v) (Minekus et al., 2005), reduce la bioaccesibilidad del colesterol (1,1 a 22 veces), aunque la magnitud del efecto varía considerablemente entre estudios. A diferencia de los modelos en tubo de ensayo, no se observa una relación directa entre la fibra soluble y una mayor reducción de la bioaccesibilidad de colesterol, siendo además mayor la efectividad si las cantidades de fibra soluble e insoluble son similares (López-Marcos et al., 2015). En contraste a lo indicado, la incorporación de fibra soluble (pectinas) e insoluble (celulosa y quitosano) a empanadas de ternera al 0.5% (p/p), no produce un cambio significativo en la bioaccesibilidad del colesterol (Hur et al., 2009).

No se ha evaluado hasta el momento la potencial interacción de los GOS con compuestos lipofílicos durante la digestión gastrointestinal, y por tanto se desconoce su efecto sobre la bioaccesibilidad del colesterol y los EV. Dado que los GOS comparten similitudes estructurales y fisicoquímicas con otros tipos de fibra soluble ( $\beta$ -glucanos, pectinas o FOS) con efectos potencialmente negativos sobre los esteroides, sería de interés futuros estudios que evalúen su interacción durante la digestión gastrointestinal.

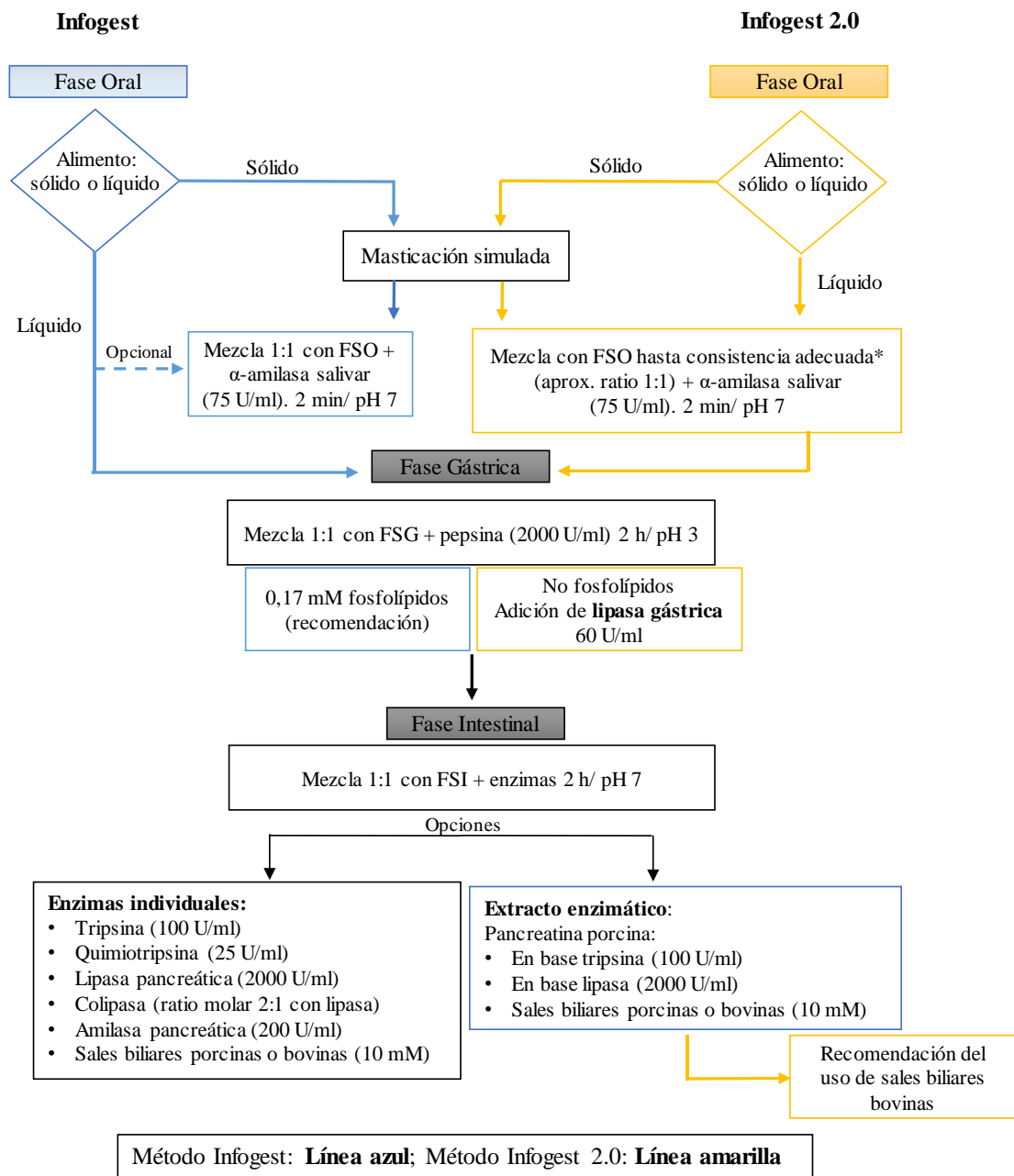
## 5.2 Método armonizado de digestión gastrointestinal estático: Infogest

Uno de los grandes problemas de los métodos de digestión gastrointestinal *in vitro* estáticos es la gran diversidad de metodologías desarrolladas, las cuales se diferencian sustancialmente en parámetros como el pH y el tiempo de cada fase de digestión, concentración y actividad enzimática y composición de fluidos digestivos. Este hecho dificulta la comparación de resultados entre diferentes grupos de trabajo (Hur et al., 2011). En este sentido, en el marco de la acción Europea

(acción COST) Infogest se ha estandarizado un método de digestión gastrointestinal estático para alimentos simple y fácil de aplicar por los diferentes grupos de investigación, que recoge los procedimientos a realizar, así como la información y justificación de todos los enzimas y reactivos utilizados (Minekus et al., 2014). Entre otros factores, los parámetros más destacados que se estandarizan son: (i) la composición iónica de los fluidos sintéticos oral (FSO), gástrico (FSG) e intestinal (FSI); (ii) las condiciones de pH y tiempo de las tres etapas digestivas (salivar, gástrica e intestinal); (iii) la adición de las enzimas en base a su actividad enzimática en lugar de concentración y extractos biliares según su contenido en ácidos biliares. A este respecto, se detalla la metodología para la evaluación de la actividad enzimática y determinación del contenido de sales biliares, como paso previo a la digestión. El método Infogest propone diferentes elecciones atendiendo a las características intrínsecas del alimento y al coste de determinadas enzimas o reactivos. Como se muestra en el diagrama de la digestión (ver figura 5), la etapa salivar es opcional para alimentos líquidos o semisólidos, debido a su bajo tiempo de permanencia en la boca y que no requieren proceso de masticación para su ingestión, con excepción de aquellos que contengan almidón. En cambio, para alimentos sólidos se debe simular la masticación mediante métodos manuales o automáticos (i.e. homogenizador Stomacher), y la mezcla con el FSO debe alcanzar una consistencia similar a la pasta de tomate o mostaza. La fase gástrica propuesta garantiza la digestión proteica (mediada por la presencia pepsina y el HCl) del alimento, sin tener en cuenta que en el estómago se inicia también la hidrólisis lipídica por acción de la lipasa gástrica. Se indica que no existen comercialmente lipasas que actúen eficientemente al pH gástrico (pH 2) y se propone el uso de emulgentes como la fosfatidilcolina para favorecer la emulsificación de las grasas y su posterior hidrólisis en la etapa intestinal.

En la fase intestinal, se plantean dos opciones para alcanzar la actividad enzimática requerida para la digestión. La primera de ellas, más simple y económicamente más barata, es utilizar un extracto pancreático (pancreatina) de origen generalmente porcino, el cual contiene las enzimas más relevantes a un ratio similar al de extractos humanos. La adición de pancreatina se realiza en base a la actividad enzimática de tripsina o lipasa, dependiendo de la naturaleza del compuesto a analizar (proteico o lipídico).

**Figura 5.** Digestión gastrointestinal estandarizada Infogest



\*Consistencia similar a pasta de tomate o mostaza. **FSO**: fluido sintético oral; **FSG**: fluido sintético gástrico; **FSI**: fluido sintético intestinal

(Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014)

En el caso de no alcanzar la actividad requerida durante la digestión, se adicionan enzimas individuales para alcanzarla. La segunda opción utiliza proteasas, amilasas y lipasas (además de colipasa) individuales (ver figura 5), debiendo evaluar la actividad enzimática de todas ellas, tarea laboriosa y costosa en términos económicos y de tiempo. En ambas opciones, se debe garantizar el aporte de sales biliares (10 mM) procedentes de extractos biliares de origen porcino o bovino o bilis fresca porcina extraída directamente de la vesícula biliar. Se debe tener especial atención en la

conservación del digerido, encaminada a inhibir o ralentizar la acción enzimática sobre el alimento. En general, se recomienda la inmersión inmediata del digerido en nitrógeno líquido, con previa neutralización del pH ácido gástrico (en el caso de que sea el punto final del estudio) o adición de inhibidores de proteasas como el Pefabloc®.

Recientemente se ha propuesto una modificación del protocolo original que se conoce como método Infogest 2.0 (ver figura 5) (Brodkorb et al., 2019). La finalidad del método 2.0 es alcanzar una mayor armonización entre laboratorios, simplificar y mejorar la reproducibilidad de las metodologías usadas para la evaluación de la actividad enzimática y aproximarse en mayor medida a las condiciones fisiológicas de la digestión lipídica en humanos. Entre los cambios propuestos destacan: (i) la obligatoriedad de la fase oral para todos los alimentos (líquidos y sólidos); (ii) la inclusión de lipasa gástrica (60 U/ml de digerido gástrico) resistente a la desnaturalización de pH ácido; (iii) uso preferente de sales biliares bovinas en lugar de porcinas por su similitud con las humanas; (iv) modificaciones de reactivos utilizados para el cálculo de la actividad enzimática y el contenido de sales biliares; y (v) diferentes propuestas para finalizar las etapas de la digestión (fundamentalmente inhibidores de amilasas, lipasas y proteasas) que preserven el analito a estudiar.

Desde su publicación, el método Infogest se ha aplicado a diversos alimentos tales como frutas y hortalizas (Eriksen et al., 2016; Estévez-Santiago et al., 2016), cereales (Bustos et al., 2017), leche y derivados lácteos (Nehir El et al., 2015; Bohn et al., 2018), carnes y productos cárnicos (Gallego et al., 2018; Baugreet et al., 2019) y microalgas (Cavonius et al., 2016), con la finalidad de evaluar aspectos como la digestibilidad de macronutrientes, efecto del tratamiento culinario o la bioaccesibilidad de minerales y compuestos bioactivos/antioxidantes. En relación a compuestos lipofílicos, los carotenoides ( $\beta$ -Cx, zeaxantina, luteína e isómeros del caroteno) son los compuestos de los que mayor información se dispone en la actualidad, tanto en términos de eficiencia de hidrólisis (ruptura del enlace éster durante la digestión) como de bioaccesibilidad (Nehir El et al., 2015; Eriksen et al., 2016; Estévez-Santiago et al., 2016; Rodrigues et al., 2016; Wen et al., 2018). Sólo se conocen dos estudios que apliquen el método Infogest con la finalidad de evaluar esteroides en alimentos, concretamente el colesterol en empanadas de cerdo adicionadas con extractos de fibra de distintas fuentes alimentarias (López-Marcos et al., 2015) y un estudio reciente con EV sobre del impacto del contenido de grasa en *snacks* de granola (Ubeyitogullari & Ciftci, 2019). Aunque el método Infogest es un buen punto de partida, se han sugerido algunas modificaciones para evaluar la bioaccesibilidad de compuestos lipofílicos. Uno de los inconvenientes observados en la aplicación del método a lípidos es que no estandariza la actividad enzimática de otras enzimas involucradas en el metabolismo lipídico como la colesterol esterasa, encargada de la hidrólisis del enlace éster de carotenoides y

esteroles (entre otros). Las formas esterificadas de estos compuestos difícilmente pueden incorporarse a las micelas mixtas durante la fase intestinal, lo que reduce considerablemente su bioaccesibilidad (Estévez-Santiago et al., 2016). En este sentido, se ha indicado que la incorporación de colesterol esterasa (1-4 U/ml digerido) en la fase intestinal favorece notablemente la bioaccesibilidad de la zeaxantina, aunque no de forma dosis dependiente. Además, el efecto de esta enzima (incluso a bajas unidades) tiene un mayor impacto sobre la bioaccesibilidad que el incremento de la actividad de lipasa pancreática (500-2000 U/ml). Se propone la adición de 1 U/ml de colesterol esterasa en la fase intestinal, de modo que se garantice la máxima bioaccesibilidad para aquellos componentes lipídicos esterificados en el alimento (Wen et al., 2018).

Otra fuente de variabilidad entre los estudios sobre bioaccesibilidad es el método de obtención de la fracción bioaccesible, el cual no se encuentra estandarizado y depende de la finalidad del estudio. Destacar que para esteroles y carotenoides generalmente se utiliza la centrifugación, si bien la velocidad y el tiempo varía considerablemente en función del estudio, oscilando entre 4500-75000 g y 10-60 minutos, respectivamente. Señalar que Rodrigues et al. (2016) proponen para carotenoides alcanzar al menos 20000 g/ 5min para garantizar la separación de la fase acuosa y la fase micelar en el digerido gastrointestinal. También se ha propuesto el borboteo de nitrógeno durante la digestión gastrointestinal para evitar la oxidación de la grasa y compuestos antioxidantes (Eriksen et al., 2016).

## 6. Efectos biológicos de esteroides vegetales y galactooligosacáridos

El efecto más conocido de los EV sobre el organismo humano es el hipocolesterolemizante. Además, pueden tener otros efectos adicionales tales como: el antiinflamatorio y de defensa frente a estrés oxidativo y anticancerígeno. Así mismo, se ha indicado que los GOS podrían ejercer efectos beneficiosos sobre la salud intestinal, la función inmunológica y marcadores de riesgo cardiovascular. Para la evaluación de los efectos biológicos de los EV y/o GOS se disponen de diferentes modelos *in vitro* (células tumorales, no tumorales y cultivos primarios), *ex vivo* (células sanguíneas e inmunitarias principalmente) e *in vivo* (humanos y animales). A continuación, se describen los principales modelos utilizados para abordar los estudios de bioactividad, haciendo hincapié en aquellos utilizados en la presente tesis doctoral.



## 6.1 Modelos biológicos

### ➤ Modelos *in vitro*: células Caco-2

En general, los modelos *in vitro* basados en células humanas son cada vez más utilizados como modelos preclínicos debido a su simplicidad, reproducibilidad interlaboratorio y capacidad de ensayar multitud de condiciones en un tiempo reducido. Aunque estos sistemas no son capaces de reproducir la complejidad de las enfermedades humanas, han permitido entender algunos aspectos bioquímicos fundamentales, así como ayudado a seleccionar agentes con propiedades potencialmente beneficiosas y elucidar su posible mecanismo de acción (López-García et al., 2018).

Entre las líneas celulares más utilizadas se encuentran las células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2. Esta línea celular se establece en 1977 por Fogh y sus colaboradores, a partir de un adenocarcinoma de colon humano procedente de un paciente de 72 años de raza caucásica. Se caracterizan por crecer en soportes físicos (pocillos, frascos, Transwells®...) en forma de monocapa celular fuertemente cohesionada, la cual tras alcanzar la confluencia se diferencia espontáneamente. La diferenciación celular da lugar a una monocapa polarizada que presenta características funcionales y morfológicas de los enterocitos humanos maduros: formación de microvellosidades en la parte apical, expresión de enzimas del borde en cepillo como la sacarasa-isomaltasa y fosfatasa alcalina y uniones intercelulares estrechas (Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989).

Las células Caco-2 diferenciadas se consideran un modelo validado de epitelio intestinal y son utilizadas para evaluar el efecto citoprotector y antiinflamatorio de componentes bioactivos tras la exposición aguda a un agente oxidante y/o proinflamatorio. Dichos agentes simularían algunos procesos fisiopatológicos como la pérdida de la integridad de la monocapa celular (función barrera), producción/activación de mediadores proinflamatorios (prostaglandinas, citoquinas IL-6 e IL-8 y factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)), sobreproducción de ROS y especies reactivas del nitrógeno (iNOS) y alteración del crecimiento celular (apoptosis, necrosis y cambios en el ciclo celular) (Van De Walle et al., 2010; Guina et al., 2015; Deiana et al., 2017). Los compuestos oxidantes más utilizados en este modelo son el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y *tert*-butilhidroperóxido, aunque cada vez hay más estudios que utilizan compuestos presentes de forma natural en los alimentos como los COPs (Biasi et al., 2009; Biasi et al., 2013). Mientras que entre agentes inductores de inflamación destacan el lipopolisacárido (LPS) bacteriano y el uso de citoquinas proinflamatorias tales como la IL-1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Van De Walle et al., 2010). En la actualidad, las células Caco-2 se han utilizado para evaluar las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias *in vitro* de diferentes compuestos bioactivos como polifenoles (Xiong et al., 2019) o carotenoides (Katz et al., 2014), así como alimentos y sus

fracciones bioaccesibles (Cilla et al., 2018b) y ha servido como modelo complementario en estudios con ratones para elucidar posibles mecanismos de acción implicados en la EII (Mayangsari & Suzuki, 2018).

Por otro lado, las Caco-2 no diferenciadas pueden ser utilizadas como modelo tumoral. Para ello se debe garantizar que las células se encuentren en fase de crecimiento exponencial y evitar la formación de una monocapa celular consolidada. Las células tumorales son utilizadas para evaluar la actividad antiproliferativa de compuestos bioactivos o extractos de alimentos y sirven como herramienta de *screening* para la selección de compuestos con un potencial efecto anticanceroso (Ahmed et al., 2013). Entre los parámetros más estudiados se encuentran: la inhibición de la proliferación celular, distribución del ciclo celular (arresto en alguna determinada fase) e inducción de la muerte celular programada (apoptosis). Además de las Caco-2, otras líneas de cáncer de colon ampliamente utilizadas son las HT-29, HCT-116 y COLO 320 (Awad et al., 1996; Choi et al., 2003; Baskar et al., 2010).

➤ *Caenorhabditis elegans*

*C. elegans* es un nematodo no parasitario de aproximadamente 1 mm de longitud y con un número de células que oscila entre 550-1300 dependiendo del estado larvario (L1-L4 y edad adulta). El nematodo presenta diferentes tejidos altamente diferenciados como el muscular, intestinal, nervioso y epitelial, lo que lo convierte en un modelo más complejo que los *in vitro* basados en células (Tejeda-Benitez & Olivero-Verbel, 2016). Las principales ventajas del uso de *C. elegans* para el estudio del estrés oxidativo, la inflamación y longevidad radica en la alta organización del epitelio intestinal, la rapidez de generar nematodos genéticamente modificados y su corto ciclo de vida (aproximadamente 20 días a 25°C). Además, muestra rutas de señalización altamente conservadas, como son las de defensa frente a estrés oxidativo, apoptosis celular o metabolismo de nutrientes (Lin & Hackam, 2011; Moreno-Arriola et al., 2014). Este modelo ha sido ampliamente utilizado para evaluar el efecto protector de fitoquímicos (flavonoides, antocianinas, glicósidos...), alimentos de origen vegetal (frutas, té y aceite de oliva) y extractos vegetales frente al estrés oxidativo y aumento de la esperanza de vida del nematodo. En general, se observa que el efecto beneficioso de muchos compuestos bioactivos se produce por la inactivación de la ruta de la insulina (*insulin/insulin-like growth factor pathway*, (IIGP)) y activación del factor de transcripción DAF-16 (Dong et al., 2012). La ruta IIGP se inicia con unión de insulina o péptidos similares al receptor de membrana DAF-2, lo que desencadena una cascada secuencial de fosforilación que secuestra el factor DAF-16 en el citoplasma de las células. Bajo condiciones de estrés (oxidativo, térmico o ausencia de nutrientes) la ruta se bloquea y el factor DAF-16 puede translocarse al núcleo de la célula estimulando la expresión de

genes que codifican enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa -2) y otros relacionados con la extensión de la longevidad (Sun et al., 2017). Por lo tanto, se ha sugerido que los compuestos bioactivos, al igual que algunos fármacos antiinflamatorios, podrían inhibir la ruta IIGP favoreciendo la resistencia del nematodo a diferentes estreses y la longevidad del mismo (Dong et al., 2012; Koch et al., 2014).

#### ➤ *Murinos*

A pesar de no existir modelos animales que reproduzcan la etiopatología de las EII, se han desarrollado modelos experimentales de inflamación intestinal (principalmente colitis) con rasgos histopatológicos y bioquímicos similares a los observados en la enfermedad humana. Entre ellos se encuentran los modelos espontáneos de colitis, los inducibles por agentes químicos, los modelos genéticamente modificados o por transferencia adoptiva de células. Los más utilizados en la actualidad son los inducidos por agentes químicos como el ácido acético o ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) vía intrarectal o bien polisacáridos sulfatados como el sulfato de dextrano sódico (DSS) por administración oral (Almero, 2007). La inducción de colitis por DSS presenta ventajas importantes en comparación con los otros modelos de colitis, entre las que destacan: (i) capacidad de producir una fase aguda, crónica y periodos de remisión-recaída con cambios en la concentración del compuesto y la frecuencia de exposición; (ii) aparición de displasia en el tejido colónico tras la exposición crónica de forma similar a lo que ocurre frecuentemente en humanos; (iii) validación con diferentes agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de las EII en humanos (Perše & Cerar, 2012). Los modelos de colitis se han utilizado para evaluar el efecto positivo de diferentes nutrientes y no nutrientes tales como probióticos (*Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*), prebióticos (FOS e inulinas), vitaminas liposolubles (A y D), ácidos grasos (mono y poliinsaturados), péptidos bioactivos y fitoquímicos (polifenoles, compuestos sulfurados, curcumina, etc.) sobre el proceso inflamatorio agudo y crónico (Al Mijan & Lim, 2018).

## 6.2 Hipocolesterolemia

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte prematura en países desarrollados, con un número de muertes anual de 17,8 millones en el mundo (Kaptoge et al., 2019). La acumulación de colesterol en los tejidos y en la sangre (hipercolesterolemia) favorecen la formación de placas de ateromas y aparición de aterosclerosis, considerado un importante factor de riesgo cardiovascular. Por ello, un adecuado control de la homeostasis del colesterol, es decir, el equilibrio entre el aporte de colesterol (por la dieta y de síntesis endógena) y la excreción por las heces, es una estrategia para la reducción del riesgo cardiovascular (Gylling & Simonen, 2016).

Se ha indicado que ingestas de 0,6-3,3 g/día de EV reducen un 6-12 % los niveles plasmáticos de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) (Ras et al., 2014). Es conocido que niveles elevados de c-LDL en plasma se relaciona con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, y en particular con la formación de placas de ateromas (Carr et al., 2019). La reducción de c-LDL producida por EV es gradual y dosis dependiente hasta 2 g/día, con una ligera reducción adicional a 3 g/día. En el caso de bebidas a base de zumo de frutas y leche, trabajos previos del grupo de investigación han evaluado la influencia de bebidas con  $\beta$ -Cx o EV (1,5 g/día) o  $\beta$ -Cx + EV sobre marcadores de riesgo cardiovascular y de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Los autores demostraron que sólo la ingesta de la bebida con  $\beta$ -Cx + EV reduce un 5-7% los niveles séricos de colesterol total, c-LDL y c-HDL, así como marcadores de remodelado óseo hasta un 5%, demostrando que la presencia de  $\beta$ -Cx favorece el efecto hipocolesterolemiante de los EV (Granado-Lorencio et al., 2014). En un estudio posterior, la ingesta de bebidas similares ( $\beta$ -Cx + EV (2g/ día)) adicionadas con MFGM produce un efecto hipocolesterolemiante (reducción de colesterol total y c-LDL un 2,9-5,1 %) y una reducción de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  (6,7%) y aumento de las antiinflamatorias como la IL-10 (22,5%) en mujeres postmenopausicas (Alvarez-Sala et al., 2018a).

En relación a los GOS, estudios *in vivo* en humanos (Vulevic et al., 2013) y ratón (Hashmi et al., 2016; Dai et al., 2017; Chen et al., 2019), sugieren que su ingesta podría estar relacionada con una reducción de los niveles plasmáticos de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos. Señalar que los estudios sobre el efecto hipocolesterolemiante de los GOS son preliminares y el mecanismo de acción no se ha elucidado. Se ha sugerido que su efecto está relacionado con un cambio en la microbiota intestinal a favor de bacterias metabolizadoras de sales biliares y/o productoras de AGCC (Vulevic et al., 2013; Chen et al., 2019).

### 6.3 Antiproliferativo y anticanceroso

Datos de 2018 de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) estiman en 18 millones los nuevos casos de cancer y 9,5 millones las muertes en el mundo por esta enfermedad. En hombres el cáncer de pulmón es el que mayor incidencia presenta (14,5%), seguido de próstata (13,5%) y colorectal (10,9 %). En cambio, en mujeres el cáncer de mama es con diferencia el más común (24,2 %), seguido por colorectal (9,5 %) y pulmón (8,4 %) (OMS, 2018). El cáncer es una enfermedad multifactorial en la que participan factores genéticos y ambientales, y donde la alimentación parece tener un impacto relevante (Arends et al., 2017). Las evidencias apuntan que el consumo de frutas y verduras, en el contexto de un estilo de vida saludable, está inversamente relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer y, en particular, cáncer colorectal (Miller & Snyder,

2012). Se ha sugerido que la presencia de compuestos fitoquímicos como los EV podrían tener un papel importante en la prevención del cáncer (Awad & Fink, 2000; Ramprasath & Awad, 2015; Shahzad et al., 2017). En la actualidad los estudios epidemiológicos que evalúan la asociación entre la ingesta de EV y el riesgo de cáncer de colon son contradictorios. Un estudio epidemiológico llevado a cabo en los Países Bajos muestra que la ingesta de  $285 \pm 97$  mg/día de EV no está asociada a un menor riesgo de desarrollar cáncer colorectal, e incluso se observa una asociación positiva con algunos EV como campesterol y estigmasterol (Normén et al., 2001). En cambio, un estudio caso control realizado en China indica que la ingesta de  $225 \pm 79$  mg/día de EV totales es suficiente para reducir el riesgo de cáncer colorectal hasta un 50% en hombres y mujeres (Huang et al., 2017). En este mismo sentido, un reciente metanálisis en el que se tiene en cuenta variables de confusión como la ingesta de alcohol, la energía total, índice de masa corporal o el historial familiar de cáncer, se concluye que una ingesta de 500 mg/día de EV reduce el riesgo de desarrollar tumores en el sistema digestivo (Jiang et al., 2019). Por lo tanto, con los datos disponibles en la actualidad no se puede establecer una asociación clara entre la ingesta de EV y un menor riesgo de padecer cáncer de colon.

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han evidenciado el efecto antiproliferativo y anticanceroso de los EV en cáncer de colon, así como sus mecanismos de acción.

#### ➤ *Estudios in vitro*

En general, el desarrollo del cáncer de colon se produce por un incremento descontrolado de la proliferación de las células de la mucosa colónica. La proliferación celular está controlada por dos grandes procesos bioquímicos que son la división mitótica, estrictamente regulada por el ciclo celular, y la apoptosis o muerte celular programada (Awad & Fink, 2000). La inhibición de la progresión en el ciclo celular o la activación de la apoptosis son dos características presentes en algunos agentes quimioterápicos como el 5-fluorouracilo (5-FU), ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de colon (Longley et al., 2003). Numerosos estudios *in vitro* han demostrado el efecto de los EV sobre la proliferación celular en diferentes líneas de cáncer de colon (HT-29, Caco-2, HCT-116 y COLO 320), con ausencia o ligera alteración del crecimiento y viabilidad de células no cancerosas como Caco-2 diferenciadas (Awad et al., 2005), fibroblastos (Jayaprakasha et al., 2007) y células renales (Baskar et al., 2010) en un amplio rango de concentración de 0,6-1000  $\mu$ M.

El  $\beta$ -sitosterol es el EV más estudiado y es capaz de inhibir el crecimiento celular en un 5-45 %, 21-44 % y 27-75 % en células HT-29 (Awad et al., 1996; Awad et al., 1998; Jayaprakasha et al., 2007), Caco-2 (Cilla et al., 2015) y HCT-116 (Choi et al., 2003; Alvarez-Sala et al., 2019), respectivamente, a concentraciones comprendidas entre 0,6-52  $\mu$ M y tiempos de incubación de 1 a 9 días. En Caco-2, campesterol y estigmasterol han mostrado similares resultados con una inhibición

del crecimiento del 25-40 % y 40-45 %, respectivamente, a concentraciones relativamente bajas (0,125-2  $\mu\text{M}$ ) y tiempos de incubación menores (24h) (Cilla et al., 2015). Las concentraciones utilizadas en los estudios anteriormente comentados son compatibles con las halladas en plasma (4-70  $\mu\text{M}$ ) y no con las que se podrían alcanzar en el colon. En células Caco-2 tratadas con  $\beta$ -sitosterol, campesterol y  $\beta$ -sitostanol a concentraciones superiores a las plasmáticas (5-400  $\mu\text{M}$ ), se observa que los EV no actúan sobre el crecimiento celular de una forma dosis-dependiente y los porcentajes de inhibición son similares a los obtenidos a concentraciones plasmáticas (24-47 %) (Daly et al., 2009). La falta de dosis respuesta de los EV ha sido descrita en posteriores estudios en células Caco-2 y HCT-116 (Cilla et al., 2015; Alvarez-Sala et al., 2019). Por otro lado, se ha evaluado el efecto antiproliferativo de EV individuales ( $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol) y combinados ( $\beta$ -sitosterol 87%, campesterol 8,1% y estigmasterol 4%) a concentraciones estimadas en colon tras la ingesta de una bebida enriquecida en EV (132  $\mu\text{M}$ ), simulando mejor las condiciones de los alimentos, en los que potenciales efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas podrían tener lugar (Álvarez-Sala et al., 2018b). En general, no se observan grandes diferencias en la inhibición del crecimiento celular entre los EV individuales y combinados en Caco-2 y HT-29, descartando un posible efecto antagonista. Resultados similares se obtienen con una mezcla de EV ( $\beta$ -sitosterol 93%, campesterol 8% y estigmasterol 1,8%) a concentraciones plasmáticas (6,6-26,5  $\mu\text{M}$ ) en Caco-2 (Cilla et al., 2015). Por el contrario, Montserrat-de la Paz et al. (2015), indica que la presencia simultánea de EV en un extracto de aceite de onagra (10-100  $\mu\text{g/ml}$ ) potencia el efecto inhibidor de los EV en comparación con  $\beta$ -sitosterol y campesterol aislados (10-100  $\mu\text{M}$ ) en células HT-29. Se pone de manifiesto que los EV tienen un efecto sobre la proliferación celular de diferentes líneas de cáncer de colon, aunque dicho efecto parece ser no dosis dependiente y estar relacionado con el tipo de EV estudiado o su uso de forma aislada o como mezcla.

El mecanismo de acción del efecto de los EV en células cancerosas es desconocido y se han propuesto diferentes dianas moleculares o rutas bioquímicas. A continuación, se detallan los mecanismos de acción más relevantes propuestos para la acción antiproliferativa de los EV en modelos *in vitro* de cáncer de colon y se esquematizan en la figura 6.

#### *Cambios en la membrana plasmática y cascadas de señalización asociadas*

Dada la similitud estructural de los EV con el colesterol, se ha investigado su incorporación a la membrana plasmática de células de cancerosas, así como su efecto sobre la fluidez y rutas de señalización (Shahzad et al., 2017). Awad et al. (1996) demuestran que el  $\beta$ -sitosterol es capaz de internarse en la membrana de células HT-29 produciendo cambios en la composición lipídica de la misma. Entre los efectos más destacados se observa una reducción notable del colesterol asociado a

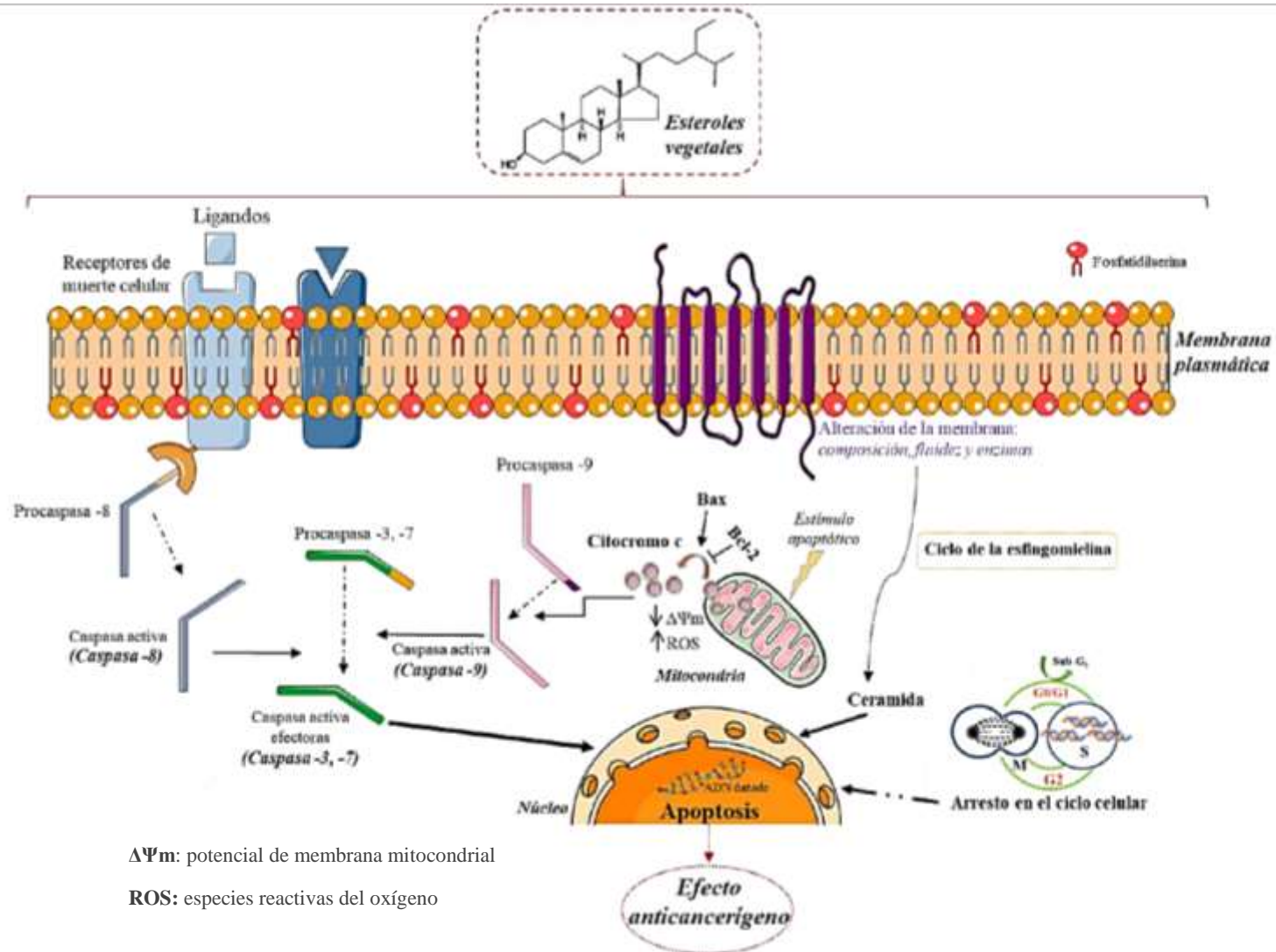
la membrana (16 %) y del contenido de esfingomielina (50 %), así como un incremento del fosfolípido fosfatidilserina (PhS) (8 %). Generalmente, los cambios en la composición lipídica de las membranas celulares producen alteraciones de su fluidez, lo que puede llevar a la pérdida de su funcionalidad y muerte celular. En este sentido, se ha indicado que la incorporación de  $\beta$ -sitosterol a la membrana plasmática produce una reducción de la fluidez y una activación de desaturasas de ácidos grasos como mecanismo compensatorio (Shahzad et al., 2017).

La principal ruta bioquímica propuesta para explicar la inhibición de la proliferación celular producida por los EV a nivel colónico es la alteración del ciclo de la esfingomielina. Éste lípido de la membrana plasmática se hidroliza bajo determinados estímulos externos (quimioterápicos, radiación, activación de receptores de muerte celular) dando lugar a ceramida, un segundo mensajero con múltiples funciones celulares como la inducción de arrestos en el ciclo celular y activación de la apoptosis (Hannun & Linardic, 1993). El tratamiento con  $\beta$ -sitosterol (16  $\mu$ M) incrementa el contenido intracelular de ceramida en células HT-29 (45 %) (Awad et al., 1996), de próstata (36%) (Von Holtz et al., 1998) y mama (85 %) (Awad et al., 2008). Similares incrementos se observan en células Caco-2 diferenciadas (50 %), aunque sin reducción de la proliferación celular. Los autores sugieren que las células Caco-2 diferenciadas podrían reducir los efectos de la ceramida mediante su glicosilación y formación de glicoesfingolípidos (Awad et al., 2005).

#### *Alteraciones del ciclo celular*

Los EV pueden actuar como inhibidores del ciclo celular, alterando la progresión normal entre las diferentes fases (ver figura 6). En general, se ha observado que el tratamiento con EV incrementa (*vs.* control) la población celular en fase sub- $G_1$  de células Caco-2 (2-4 veces) (Cilla et al., 2015) y HCT-116 (6-9 veces) (Choi et al., 2003; Alvarez-Sala et al., 2019), sin un cambio significativo en el resto de fases celulares. Sin embargo, en células HT-29 se han observado arrestos en fase  $G_0/G_1$  (Montserrat-de la Paz et al., 2015). Cabe señalar que la fase sub- $G_1$  hace referencia a aquella población de células con una dotación cromosómica inferior a las células dihaploides (“2n” de dotación cromosómica) y aunque se incluye en multitud de estudios, técnicamente no se considera que forme parte de las fases del ciclo celular. Las células en sub- $G_1$  presentan su material genético parcialmente dañado o fragmentado, evento comúnmente observado durante la apoptosis, que lo convierte en un indicador importante de muerte celular (Choi et al., 2003).

**Figura 6.** Mecanismos de acción propuestos para los esteroides vegetales en células de cáncer de colon humano



(Álvarez-Sala et al., 2018a)



### *Apoptosis*

La apoptosis es un proceso clave en el desarrollo del cáncer y puede ser activada mediante rutas de señalización dependientes de la mitocondria (ruta intrínseca) o bien independientes (ruta extrínseca). Cada vez más evidencias apuntan a que ambas rutas están estrechamente relacionadas y que algunas moléculas de una ruta pueden influir directamente en la otra. En la ruta dependiente de la mitocondria, la familia de proteínas Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bid, etc.) juegan un papel importante en la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, inhibiendo o promoviendo la liberación de moléculas proapoptóticas. Bajo estímulos como el estrés oxidativo o la presencia de citoquinas, se produce un incremento de proteínas Bcl-2 proapoptóticas (Bax o Bid) con la subsecuente creación de poros a lo largo de la membrana mitocondrial y disipación del potencial de membrana. El incremento de la permeabilidad mitocondrial promueve la liberación al citoplasma de proteínas como el citocromo C y la endonucleasa G. La presencia del citocromo C en el citosol, activa la procaspasa 9 y desencadena la formación del apoptosoma, unidad que promueve la activación de otras caspasas y finalmente la muerte celular. Por otro lado, la endonucleasa G se transloca al núcleo, en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , e inicia la degradación del material genético dando lugar a fragmentos de ADN que sirven como marcador de apoptosis. También la alteración de la función mitocondrial favorece errores en la cadena transportadora de electrones y la generación de ROS, lo que puede llevar a la alteración del balance redox celular y la oxidación de macromoléculas esenciales. En cuanto a la ruta extrínseca, la apoptosis se inicia a través de la unión de ligandos a los receptores de muerte como el Fas-R y el  $\text{TNF}\alpha$ -R ubicados en la membrana plasmática. Tras la unión del ligando, se produce un reclutamiento de proteínas adaptadoras asociadas a la procaspasa 8, la cual desencadena la respuesta proteolítica de otras caspasas. El punto final de la ruta intrínseca y extrínseca es la fase ejecutora, la cual se considera la parte final de la apoptosis. En esta última fase participan las caspasas ejecutoras (caspasa-3, 6 y 7), siendo la más importante la caspasa-3 debido a que es activada tanto por la ruta intrínseca (caspasa-9) como por la extrínseca (caspasa-8). La activación de las caspasas ejecutoras se considera un punto de no retorno en la apoptosis celular, ya que degradan el material genético y las proteínas del citoesqueleto (Elmore, 2007; Jan & Chaudhry, 2019).

El efecto proapoptótico de los EV ha sido extensamente estudiado en diferentes células cancerígenas (Awad & Fink, 2000; Ramprasath & Awad, 2015; Shahzad et al., 2017). En células HT-29, los EV inducen la desestabilización de la envoltura nuclear y fragmentación de ADN, junto con la externalización de la PhS, evento que ocurre en los primeros estadios de la apoptosis. Parece ser que ese proceso apoptótico se produce principalmente a través de la activación de la caspasa 8 (ruta intrínseca) sin afectar al potencial de membrana mitocondrial o el balance redox (ruta extrínseca)

(Jayaprakasha et al., 2007; Jayaprakasha et al., 2010; Montserrat-de la Paz et al., 2015; Álvarez-Sala et al., 2018b). En HCT-116 y Caco-2, se han descrito procesos apoptóticos similares de fragmentación del ADN y externalización de la fosfatidilserina, aunque estos eventos van acompañados generalmente de una alteración de la funcionalidad mitocondrial producida por el incremento de las proteínas Bax, liberación del citocromo C, despolarización de la membrana mitocondrial interna, incremento del calcio citosólico o desbalance del estatus redox celular (Choi et al., 2003; Cilla et al., 2015; Alvarez-Sala et al., 2019). Esto sugiere que en estas líneas celulares la ruta intrínseca estaría implicada en el proceso apoptótico, aunque en células Caco-2 se ha observado una fuerte activación de la caspasa 8 tras el tratamiento con EV (Álvarez-Sala et al., 2018b). Finalmente, en células COLO 320 el tratamiento con EV produce la muerte celular a través de un proceso combinado de apoptosis y necrosis con un marcado incremento de las ROS (Baskar et al., 2010).

➤ Estudios *in vivo*

El efecto anticanceroso de los EV en modelos *in vivo* ha sido escasamente estudiado. En estudios subcrónicos (28 días) con ratas expuestas a metil nitrosourea (agente cancerígeno), se ha observado que la administración de EV al 0,2 % (p/p) reduce la incidencia de tumores en el colon un 33 %, así como el número de tumores/ratón en un 38 % (Raicht et al., 1980). Además, se ha puesto de manifiesto que los EV (0,2 % (p/p)) reducen la actividad proliferativa de las células situadas en las criptas en un 40 %, así como ralentizan la migración de células altamente proliferativas hacia la parte superior de la cripta, lo que podría explicar la menor incidencia de tumores (Deschner et al., 1982). En ratones con tumores inducidos por ácido cólico, los EV a dosis entre 0,3-2% (p/p) producen similares reducciones de la actividad proliferativa (14-50 %), siendo este efecto dosis-dependiente. La menor actividad proliferativa se asocia con un incremento de células colónicas en fase S del ciclo celular (fase de síntesis ADN). La extensión de ésta fase del ciclo ayudaría a la célula a reparar el ADN antes de iniciar la replicación, evitando la incorporación de mutaciones en el genoma y por tanto el desarrollo del cáncer (Janezic & Rao, 1992). Otro mecanismo propuesto es la prevención de eventos relacionados con la carcinogénesis como la inflamación, lesiones en el tejido colónico y activación de la apoptosis. Sadek et al. (2017) indican que la ingesta de 0,7-2,1 % (p/p) de EV en ratones expuestos a una combinación de agentes inductores de colitis y cáncer reducen la expresión proteica de enzimas proinflamatorias como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y activan caspasas relacionadas con la ruta intrínseca y extrínseca (caspasas 3, 8 y 9).

#### 6.4 Antiinflamatorio a nivel intestinal

Las EII consisten en una disfunción crónica y de carácter inflamatorio del sistema digestivo, caracterizada por brotes agudos alternados con periodos de remisión. Las manifestaciones más comunes son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), las cuales presentan rasgos clínicos y patológicos muy similares, aunque no totalmente idénticos. La CU se caracteriza por una inflamación de la mucosa y submucosa del colon generalmente localizada en el recto, aunque puede extenderse a lo largo de todo el colon. En cambio, en la EC la inflamación puede tener lugar en cualquier parte del sistema gastrointestinal y además es transmural, afectando a otros tejidos más allá de la mucosa digestiva. Los síntomas más comunes para ambas enfermedades son los calambres y dolores abdominales, diarrea alternada con periodos de estreñimiento y la presencia de sangre en heces (Kamp et al., 2019). La mayor incidencia y prevalencia de las EII se observan en países desarrollados como los Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y Europa. La incidencia actual de UC y EC en Europa se sitúa entre 2-17 y 2-11 nuevos casos/ 100.000 habitantes al año, respectivamente, cifra que parece haberse estabilizado en los últimos 30 años. Por otro lado, la prevalencia oscila entre 43-411 y 28-322 enfermos/100.000 habitantes al año para CU y EC, respectivamente. En base a modelos predictivos, se ha señalado que la tasa de prevalencia de las EII aumentará del 0,5 % al 0,9 % entre los años 2015 y 2025, lo que supondrá un incremento del coste sanitario (Kaplan & Ng, 2017; Ng et al., 2017).

La etiología de las EII es escasamente conocida, aunque se ha indicado que existen algunos factores que predisponen su aparición: genéticos, ambientales, inmunológicos y aquellos relacionados con la alteración de la microbiota intestinal y la pérdida de la integridad del epitelio intestinal (Ng et al., 2017; Shen et al., 2018). En la actualidad no se dispone de una cura efectiva para las EII y su tratamiento farmacológico (antiinflamatorios, supresores del sistema inmune, antibióticos, anticuerpos, etc.) va orientado a minimizar los brotes agudos y mejorar la calidad de vida del paciente. En este sentido, aparecen las terapias alternativas o coadyuvantes como una forma complementaria encaminada a prolongar los periodos de remisión de la enfermedad o reducir la severidad de los síntomas clínicos. Entre las más destacadas se encuentran el uso de productos y extractos naturales o las intervenciones nutricionales. Los alimentos enriquecidos en compuestos bioactivos antioxidantes, probióticos y prebióticos son una prometedora alternativa para ayudar a la prevención de las EII (Al Mijan & Lim, 2018).

➤ Efecto de los EV y GOS sobre las EII

El estudio de la actividad anticolítica de los EV se ha llevado a cabo únicamente en modelos murinos y no existen hasta la fecha trabajos en células de colon (métodos *in vitro*), *C. elegans* o en humanos. En la tabla 1 se muestran los estudios que evalúan el efecto de los EV sobre la colitis. Para ello, se han utilizado diferentes modelos de inflamación tales como el TNBS, ácido acético, DSS y dietas ricas en grasa. El hecho de utilizar diferentes agentes inductores, junto con las diferencias en el momento de la administración de los EV (pre, post o durante la inducción de colitis) y el tiempo de exposición (3-56 días), dificulta enormemente la comparación de resultados, aunque en general se observa un efecto positivo. En el proceso colítico, los EV inhiben la activación del factor de necrosis nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la subsecuente producción de importantes citoquinas reguladoras del proceso inflamatorio como la IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el tejido colónico (Islam et al., 2008; Lee et al., 2012; Kim et al., 2014; Feng et al., 2017). Además, se han indicado efectos beneficiosos sobre otros mediadores proinflamatorios como la citoquina CSF-1 y la actividad de la COX-2 (dependiente de TNF- $\alpha$ ), cuyos incrementos se han relacionado con procesos de inflamación no controlados (Feng et al., 2017). La inhibición de la ruta NF- $\kappa$ B se produce de forma rápida tras la ingesta de EV (3 días) y permanece inhibida (total o parcialmente) tanto en inflamaciones agudas (7 días) como en subcrónicas (56 días). Por otro lado, los EV podrían ejercer un efecto antiinflamatorio en el colon a través de un mecanismo antioxidante indirecto, mediante la reducción de especies oxidantes. Se ha observado que el tratamiento con  $\beta$ -sitostetol modula la actividad de los macrófagos cercanos al colon reduciendo la producción de iNOS y por tanto previniendo las alteraciones del balance redox celular (Kim et al., 2014). En este sentido, Aldini et al. (2014) demuestran que los EV previenen la peroxidación lipídica en células colónicas y su muerte celular e, incluso promueven la regeneración del tejido colónico. Un reciente análisis metabolómico indica que los EV contribuirían a reducir la colitis en ratón mediante la regulación del balance energético del colonocito (reducción de la tasa metabólica) y la inhibición de la síntesis de ADN y ARN. Este hecho sugiere que actuarían evitando/ralentizando la proliferación no controlada de las células del colon, permitiendo al tejido repararse y cicatrizar adecuadamente (Iaccarino et al., 2019). Sin embargo, su efecto podría ir más allá de su acción local a nivel colónico ya que se ha observado una reducción de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y del LPS, así como marcadores de estrés oxidativo (malondialdehído (MDA)) en ratones alimentados con  $\beta$ -sitosterol (Awaad et al., 2013; Kim et al., 2014).

**Tabla 1.** Recopilación de estudios que evalúan el efecto de los esteroides vegetales y galactooligosacáridos sobre las EII en modelo murino

Compuestos	Dosis y tiempo	Modelo murino (inductor colitis)	Principales resultados	Referencias
<b>Esteroides vegetales (EV)</b>				
$\gamma$ -Orizanol (mezcla de ferulatos del sitosterol campesterol)	50 y 100 mg/Kg 8-16 días Co-tratamiento*	Ratones C57BL/6 (DSS 1%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Síntomas clínicos</li> <li>↓ Lesiones e infiltración leucocitaria en tejido colon</li> <li>↓ Actividad MPO</li> <li>↓ Expresión génica IL-1<math>\beta</math>, IL6 y TNF-<math>\alpha</math>, COX-2</li> <li>↓ Activación NF-<math>\kappa</math>B</li> </ul>	Islam et al., 2008
$\beta$ -Sitosterol	10 y 20 mg/Kg 3 días Co-tratamiento	Ratones C57BL/6 (TNBS 2,5 %)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Revierte acortamiento colon</li> <li>↓ Lesiones tejido colon</li> <li>↓ Actividad MPO</li> <li>↓ IL-1<math>\beta</math>, IL6 y TNF-<math>\alpha</math></li> <li>↓ COX-2 y NF-<math>\kappa</math>B</li> <li>No efecto dosis dependiente</li> </ul>	Lee et al., 2012
$\beta$ -Sitosterol	100 mg/Kg 5 días Pre-tratamiento**	Ratas Wistar (ácido acético 4%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Lesiones tejido colon, edema y áreas ulcerativas</li> <li>↓ MDA en plasma</li> <li>↓ TNF-<math>\alpha</math> en plasma</li> </ul>	Awaad et al., 2013
$\beta$ -Sitosterol	20 mg/Kg 56 días Co-tratamiento	Ratones C57BL/6 (dieta rica en grasa, 60 % Kcal de grasa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ LPS y IL-1<math>\beta</math>, IL6 y TNF-<math>\alpha</math> en plasma</li> <li>↓ Acortamiento colon</li> <li>↓ Actividad MPO</li> <li>↓ IL-1<math>\beta</math>, IL6 y TNF-<math>\alpha</math></li> <li>↓ COX-2 y iNOS</li> <li>↑ Desactivación inhibidor NF-<math>\kappa</math>B</li> <li>↓ Unión LPS y receptor TLR-4</li> </ul>	Kim et al., 2014
Complemento alimenticio: $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, campestanol y sitostanol	400 mg/Kg 38 días  Pre, Co y post-tratamiento***	Ratones Balb/c (DSS 4%, sólo durante días 14 al 24)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Síntomas clínicos</li> <li>↓ Lesiones, criptitis e infiltración leucocitaria en tejido colon</li> <li>Revierte acortamiento colon</li> <li>↓ MDA en colon</li> <li>↑ Actividad metabólica colon</li> <li>Signos regeneración tisular</li> </ul>	Aldini et al., 2014

Compuestos	Dosis y tiempo	Modelo murino (inductor colitis)	Principales resultados	Referencias
Ésteres de fitosteroles o ésteres de fitostanoles contenidos en dieta rica (41 % Kcal en grasa) o baja en grasa (10%)	Dieta conteniendo 2% (p/p) (~ 4000 mg/Kg) 28 días Pre-tratamiento	Ratones C57BL/6 (DSS 1,5 %)	<u>Dieta rica en grasa:</u> No efecto síntomas clínicos No efecto edema colon <u>Dieta pobre en grasa:</u> ↑ Síntomas clínicos ↑ Edema ↑ Lesiones, criptitis e infiltración leucocitaria en tejido colon	te Velde et al., 2015
β-Sitosterol o Estigmasterol contenidos en una dieta rica en grasa (60 %, Kcal en grasa)	Dieta conteniendo 0,4 % (p/p) (~ 1000 mg/Kg) 7 días Pre-tratamiento	Ratones C57BL/6 (DSS 1,5 %)	↓ Acortamiento del colon ↓ Hemoglobina fecal ↓ NF-κB activación ↓ Inflamación mucosa y submucosa. Estigmasterol > β-sitosterol ↓ COX-2 y CSF-1. Sólo estigmasterol	Feng et al., 2017
Complemento alimenticio: β-sitosterol, estigmasterol, campesterol, campestanol y sitostanol	400 mg/Kg 38 días Pre, Co y post-tratamiento	Ratones Balb/c (DSS 4%, sólo durante días 14 al 24)	↑ Homeostasis energética celular: ↓ glicolisis y metabolitos ciclo Krebs ↓ Síntesis aminoácidos serina y treonina ↓ Inhibición síntesis de ADN y ARN	Iaccarino et al., 2019)
<b>Galactooligosacáridos (GOS)</b>				
GOS-1 (12% oligosacáridos, 17% glucosa, 11% galactosa y 9% lactosa). GOS-2 (45% oligosacáridos, 15% lactosa, 14% glucosa y 1% galactosa)	4000 mg/Kg 13 días Pre y Co-tratamiento	Ratas Wistar (TNBS 60 mg/Kg)	↑ Bifidobacterias fecales No efecto edema tisular No efecto lesiones tejido colon No efecto actividad MPO	Holma et al., 2002
GOS (no indicada)	5000 mg/Kg 42 días Pre, Co y post-tratamiento	Ratones Smad-3 (-/-) ( <i>Helicobacter spp.</i> )	↑ Bifidobacterias fecales. No lactobacilos ↑ Células inmunitarias ( <i>natural killer</i> ) en bazo ↑ IL-15 pre-infección ↓ Lesiones, infiltración leucocitaria y criptitis	Gopalakrishnan et al., 2012
GOS (59% oligosacáridos, 21% lactosa, 19% glucosa y 1% galactosa)	Dieta conteniendo 1% (p/p) (~ 2000 mg/Kg) 14 días Pre- tratamiento	Ratones B6C3F1 (Dioxinivalenol 25 mg/Kg)	↓ Expresión génica y proteica de IL-33 No efecto sobre receptor ST2	Verheijden et al., 2015

Compuestos	Dosis y tiempo	Modelo murino (inductor colitis)	Principales resultados	Referencias
GOS (>99.8 % oligosacáridos)	5000 mg/Kg 14 días Pre-tratamiento	Ratas Sprague-Dawley ( <i>Helicobacter hepaticus</i> )	↓ Síntomas clínicos ↓ TNF- $\alpha$ y IL-1 $\beta$ en plasma	Sun et al., 2019

*\*Co-tratamiento: la ingesta de los EV se produce junto con la inducción de colitis. \*\*Pre-tratamiento: la ingesta de los EV se produce antes de la inducción de colitis. \*\*\*Post-tratamiento: la ingesta de EV continua tras finalizar la inducción de la colitis. DSS: sulfato de dextrano sódico; MDA: malonildialdehido; MPO: mieloperoxidasa; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral; COX-2: ciclooxigenasa 2; TNBS: ácido trinitrobenzeno sulfónico; NF- $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$*

En general, el tratamiento con EV mejora los síntomas clínicos, es decir, previenen parcialmente de la pérdida de peso corporal, reducen la presencia de sangre en heces y la frecuencia de diarrea. Así mismo, los ratones tratados con EV muestran una mayor longitud del colon y menor presencia de edema en comparación con los ratones enfermos, probablemente como resultado de su efecto positivo sobre el mantenimiento del epitelio del colon (Islam et al., 2008; Lee et al., 2012; Awaad et al., 2013; Aldini et al., 2014; Feng et al., 2017). Únicamente un estudio ha indicado que los EV agravan los síntomas clínicos de la enfermedad y favorecen la aparición de abscesos e infiltraciones leucocitarias en el tejido colónico (te Velde et al., 2015). La discrepancia observada en este estudio podría estar relacionada con la dosis alta de EV utilizadas, muy superior (hasta 400 veces) a las utilizadas en otros estudios. En cuanto al estudio histopatológico, los autores muestran que el tratamiento con los EV ayuda a preservar la arquitectura característica del epitelio colónico manteniendo la morfología de las criptas y su localización cercana a la submucosa, así como la alta cohesión entre los coloncitos. Además, reducen el reclutamiento de células inmunes como los neutrófilos y macrófagos en el tejido colónico (menor actividad mieloperoxidasa (MPO)), contribuyendo a reducir los niveles de mediadores proinflamatorios como las citoquinas y las especies reactivas. Por todo ello, se deduce que la administración de EV individuales como el  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol o bien mezclas complejas ( $\gamma$ -oryzanol o complementos alimenticios) podrían ser útiles para prolongar los periodos de remisión de la enfermedad o atenuar los síntomas asociados. En este sentido, el uso de alimentos enriquecidos en EV podría ser una buena estrategia para alcanzar dicho fin. Aunque son necesarios estudios que evalúen el efecto de los EV sobre la colitis en el contexto de una matriz alimentaria.

Los GOS se han propuesto como candidatos para la prevención de las EII debido a su habilidad de promover la proliferación selectiva de bacterias beneficiosas (bifidobacterias y los lactobacilos) y reducir bacterias Gram (-) perjudiciales (*Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* y *Clostridium histoliticum*) en el colon (Laurell & Sjöberg, 2017). Este hecho es relevante ya que la alteración de la microbiota intestinal (disbiosis) es frecuente en pacientes con CU y EC (Shen et al., 2018). Además, estudios clínicos en humanos han demostrado que el consumo de GOS en formato polvo reconstituible (5,5 g/día) tiene un efecto antiinflamatorio sistémico reduciendo diferentes marcadores como la calprotectina en heces y la proteína C reactiva y citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en plasma (Vulevic et al., 2008; Vulevic et al., 2013). Sin embargo, el efecto específico de los GOS sobre las EII en humanos ha sido escasamente estudiado. En este sentido, Silk et al. (2009) demuestran que la ingesta de 3,5-7 g/día de GOS en forma de pastillas masticables incrementa los niveles de bifidobacterias en el colon y alivian los síntomas clínicos asociados a la colitis ulcerosa, aunque no se propone un posible mecanismo de acción.



El efecto de los GOS sobre la colitis inducida en ratas y ratones es controvertido (ver tabla 1). La administración de dos tipos de GOS (derivados de suero o de lactosa) a una dosis de 4g/Kg/día, previo a la inducción de colitis por TNBS, no reduce las lesiones en el epitelio colónico, la presencia de edema o la infiltración leucocitaria, a pesar de incrementar los niveles de bifidobacterias en el colon (Holma et al., 2002). En cambio, en un modelo de ratones mutantes inmunodeprimidos, una dosis de 5 g/Kg/día de GOS disminuye la inflamación inducida por *Helicobacter hepaticus* a través de la modulación de la función y migración de las células “natural killer” e incremento de la IL-15 y de los niveles de bifidobacterias (Gopalakrishnan et al., 2012). De forma similar, en ratas mutantes inmunodeprimidas tratadas con GOS a una dosis de 5 g/Kg/día, se produce una reducción de los síntomas de la enfermedad (principalmente diarrea) y una disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias en plasma en comparación con el grupo con colitis inducida por la infección con *Helicobacter hepaticus* (Sun et al., 2019). En un modelo de disfunción de la barrera intestinal inducida por la micotoxina deoxinivalenol, la administración de GOS (~ 2g/Kg/día) reduce la expresión de IL-33 y su distribución en el intestino delgado, citoquina asociada a efectos proinflamatorios en EII (Verheijden et al., 2015).

En modelos *in vitro* se ha estudiado si los GOS podrían ejercer un efecto adicional sobre la colitis de forma independiente a la microbiota intestinal. En este sentido, se ha indicado que los GOS podrían actuar como ligando de los receptores tipo “Toll-4” (TLR-4). La activación de estos receptores por la presencia de LPS (entre otros) desencadena una cascada de señalización que desemboca en la activación de la ruta NF- $\kappa$ B y la posterior síntesis de citoquinas proinflamatorias. En células Caco-2 diferenciadas se ha demostrado que la co-incubación de GOS (5mg/mL/ 1h) con LPS reduce considerablemente la producción de citoquinas dependientes de NF- $\kappa$ B tales como GRO- $\alpha$  y MCP-1 (Ortega-González et al., 2014). En la misma línea, Newburg et al. (2016) observan que el tratamiento con GOS (5 mg/mL) bloquea la translocación del factor NF- $\kappa$ B al núcleo celular y atenúa la producción de IL-8 inducida por el TNF- $\alpha$ . En células epiteliales de colon humano (cultivo primario) pre-incubadas con GOS (20 mg/mL) se observa un efecto citoprotector (supresión de apoptosis y eventos pro-apoptóticos) y anti-inflamatorio (reducción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) frente a la respuesta pro-inflamatoria del LPS. Este efecto preventivo de los GOS está estrechamente ligado a la modulación de microARNs y en particular a la activación del microARN-19b (Sun et al., 2019). Otro efecto observado de los GOS en células Caco-2 diferenciadas, es el de mejorar la integridad de la monocapa celular mediante la estimulación de la síntesis de uniones estrechas (Akbari et al., 2017; Perdijk et al., 2019). Akbari et al. (2017) observan que los tratamientos con GOS de diferentes GP incrementan la formación de uniones estrechas de forma dosis dependiente (0,5-20 mg/mL) y previenen de la disrupción de la integridad de la monocapa celular e incremento de la IL-8 inducidos por el

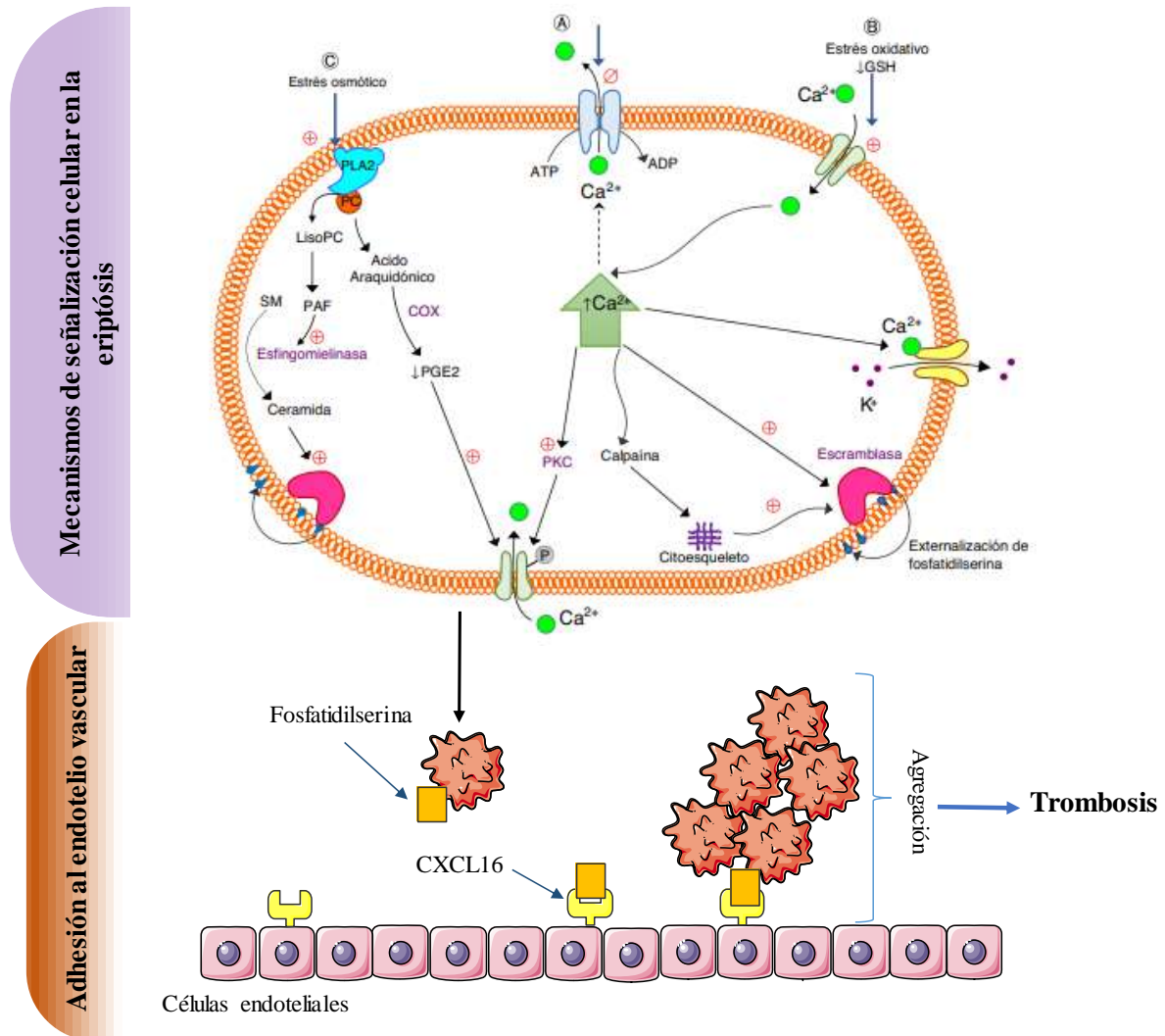
deoxinivalenol. Los GOS con GP entre 2 y 3 son los que mayor efecto presentan, mientras que oligosacáridos con GP superiores a 4 no son efectivos.

## 6.5 Antieriptótico

La eriptosis es el proceso de muerte celular programada en eritrocitos y comparte algunos procesos celulares con la apoptosis convencional como son la disminución del volumen celular, vesiculación de la membrana y la exposición de la PhS a la superficie celular. Este proceso permite al organismo eliminar de la circulación sanguínea eritrocitos envejecidos (100-120 días) o dañados, lo cuales son susceptibles de sufrir hemólisis. La eriptosis, a diferencia de la hemólisis, produce la muerte celular sin dar lugar a una reacción inflamatoria sobre las células vecinas y evita la liberación de hemoglobina al torrente sanguíneo, la cual puede precipitar durante la filtración renal produciendo obstrucciones en los tubos renales (Lang & Lang, 2015). La eriptosis también es un mecanismo de defensa frente a enfermedades como la malaria, eliminando de la circulación células infectadas con el parásito. Sin embargo, el exceso es un rasgo común en diferentes patologías humanas como la anemia, problemas renales, fallos hepáticos, enfermedades inflamatorias crónicas, obesidad y aterosclerosis (Bissinger et al., 2019). Los eritrocitos eriptóticos son propensos a adherirse a las células endoteliales y a las plaquetas, impidiendo la microcirculación y favoreciendo la formación de trombos en los vasos sanguíneos. Se ha descrito que la externalización de la PhS de la membrana permitiría a los eritrocitos eriptóticos interactuar con los receptores de membrana CXC (principalmente CXCL16) presentes en las células endoteliales promoviendo su agregación a la pared de arterias y vasos (ver figura 7) (Lang et al., 2014; Manzur-Jattin et al., 2016).

El exceso de eriptosis puede producirse por la exposición a sustancias exógenas (metales pesados, quimioterápicos, micotoxinas, fitoquímicos, etc.) o moléculas endógenas (citoquinas, prostaglandinas, anticuerpos, etc.), así como cambios en el medio extracelular como el estrés osmótico y oxidativo o la reducción de los niveles de ATP celulares (Lang & Lang, 2015). Como se muestra en la figura 7, el incremento del contenido intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  parece ser el evento clave para que tenga lugar la eriptosis. Dicho incremento estimula la actividad de las escramblasas, enzimas encargadas de la translocación de la fosfatidilserina, así como de la endopeptidasa calpaína, involucrada en la degradación del citoesqueleto y la vesiculación de la membrana plasmática. Por otro lado, el  $\text{Ca}^{+2}$  activa los canales de  $\text{K}^{+}$  sensibles a  $\text{Ca}^{+2}$  favoreciendo la salida de  $\text{K}^{+}$  al medio extracelular, la hiperpolarización de la membrana plasmática y la salida de  $\text{Cl}^{-}$  por gradiente eléctrico. La pérdida de  $\text{KCl}$  favorece la salida de agua por ósmosis disminuyendo el volumen celular. Señalar que el aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  activa a la proteína quinasa C (PKC) que fosforila canales iónicos que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  adicional, potenciando la señal proeriptótica.

**Figura 7.** Señalización celular de los procesos eriptóticos producidos por los diferentes inductores (estrés osmótico, oxidativo y depleción energética) y actividad trombogénica de los eritrocitos eriptóticos



**COX:** ciclooxigenasa; **CXCL16:** receptor de membrana CXC; **GSH:** Glutatión reducido; **PAF:** factor de agregación plaquetaria; **PC:** fosfatidilcolina; **PGE2:** prostaglandina E2; **PKC:** proteína quinasa C; **PLA2:** fosfolipasa A2; **SM:** esfingomielina; estimulación ( $\oplus$ ); inhibición ( $\otimes$ ).

Adaptada de Manzur-Jattin et al. (2016)

El aumento de  $Ca^{+2}$  puede producirse por diferentes rutas dependiendo del estímulo. En el caso del estrés energético, la disminución del ATP celular reduce la actividad de la ATPasa de  $Ca^{+2}$  y en consecuencia disminuye su salida al medio extracelular. Bajo estrés osmótico, la PLA2 citosólica hidroliza la PC en ácido araquidónico y lisoesfingolípidos. El ácido araquidónico se transforma en prostaglandina E2 por acción de la COX y activa canales iónicos inespecíficos que favorecen la entrada de  $Ca^{+2}$ . Por otro lado, los lisoesfingolípidos derivados de la PC en presencia del factor de agregación plaquetario estimulan la acción de la esfingomielinasa y la consiguiente producción de ceramida a partir de esfingomielina. La ceramida formada puede actuar sobre las escramblasas y

promover la externalización de PhS. Finalmente, el estrés oxidativo puede producir la depleción de GSH del eritrocito y activar canales iónicos sensibles a redox que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la célula (Manzur-Jattin et al., 2016; Bissinger et al., 2019).

El estrés oxidativo es uno de los estímulos proeriptóticos más potentes, por esa razón se han propuesto los antioxidantes como una estrategia para su prevención (Bissinger et al., 2019). En una extensa revisión sobre inhibidores de la eriptosis se ha indicado que algunos antioxidantes dietéticos como el resveratrol, la vitamina E o la naringina previenen parcialmente la desregulación del balance redox y la activación de la eriptosis en modelos *ex vivo* (Lang & Lang, 2015). En la actualidad, solo un estudio ha evaluado el efecto de los EV sobre la eriptosis y hemolisis. Se observa que los EV (mezcla conteniendo  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol y brasicasterol) en forma libre y esterificados con ácido gálico, reducen el grado de hemolisis y previenen la depleción de GSH producida por un agente formador de radicales peroxilo. El análisis por microscopía óptica confocal revela que los EV protegen parcialmente de la aparición de rugosidades en la membrana plasmática (evento relacionado con la apoptois) y zonas con ángulos marcados característicos de la peroxidación lipídica. Se sugiere que la capacidad de los EV de internarse en la membrana favorecería su estabilización y ayudaría a mantener su integridad, evitando los cambios morfológicos. Además, en el caso de los EV esterificados con ácido gálico, observan una reducción de los niveles de productos de oxidación de la membrana plasmática, probablemente como resultado de la conocida actividad antioxidante del ácido gálico (Liu et al., 2016b). Por lo tanto, los efectos beneficiosos de los EV sobre la muerte celular y la preservación de la morfología de los eritrocitos podrían contribuir, junto con su conocido efecto hipocolesterolemizante, a la prevención de la aterosclerosis. Sin embargo, los POPs podrían contribuir al proceso eriptótico, ya que sus análogos del colesterol (COPs) han mostrado propiedades proeriptóticas en modelos *ex vivo* con eritrocitos humanos. En un estudio, donde ha participado nuestro grupo de investigación, se demuestra que los COPs activan diferentes eventos implicados en la eriptosis como son la reducción del tamaño celular, translocación de la fosfatidilserina y desregulación del balance redox. Los COPs inducen eriptosis mediante un mecanismo dependiente de estrés oxidativo, aunque independiente del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (Tesorriere et al., 2014).

## 6.6 Otros efectos

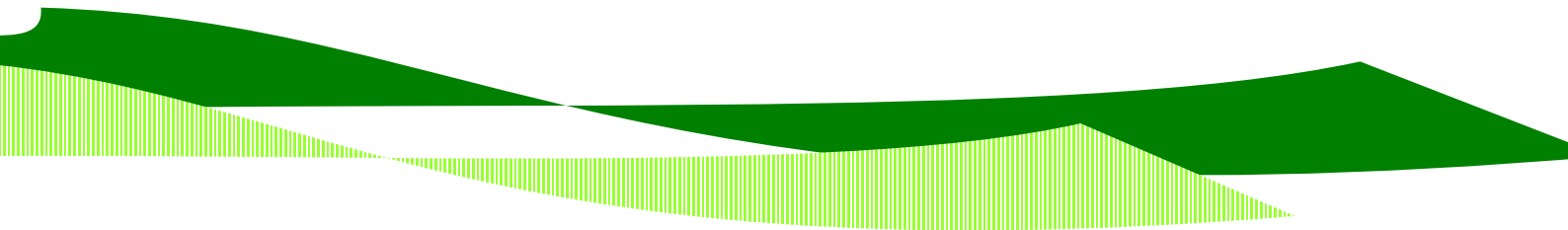
Se ha descrito que los EV pueden ejercer otras funciones beneficiosas en el organismo humano, si bien los estudios son preliminares y basados principalmente en modelos preclínicos. En cultivos celulares y animales se ha observado que los EV tienen un impacto positivo sobre procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos, así como en la progresión de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la alteración del metabolismo del colesterol como el Alzheimer y la esclerosis múltiple (Vanmierlo et al., 2015). Por otro lado, en modelos animales se indica que los EV podrían ayudar a prevenir desórdenes metabólicos como la obesidad y la diabetes, reduciendo los niveles de glucosa en sangre, la acumulación de grasa visceral y hepática (Misawa et al., 2012) y la pérdida de peso corporal gradual (Furlan et al., 2013), si bien este último efecto es controvertido (Calpe-Berdiel et al., 2008). Así mismo, se han descrito efectos positivos de los EV sobre la esteatohepatitis no alcohólica, caracterizada por niveles elevados de colesterol y triglicéridos en sangre, entre otros (Plat et al., 2014).

Por lo que respecta a los GOS, estudios en ratones sugieren que podrían ayudar a la prevención del cáncer colorrectal, reduciendo la incidencia de biomarcadores como la aparición de criptas aberrantes, ralentizando la proliferación de células tumorales y reduciendo el tamaño y la multiplicidad de tumores colónicos (Qamar et al., 2016; Fernández et al., 2018). Los mecanismos de acción propuestos para los GOS son: (i) reducción de enzimas bacterianas (azoreductasas y  $\beta$ -glucosidasas) relacionadas con la producción de compuestos genotóxicos (sales biliares y fármacos); (ii) modulación de la microbiota a favor de poblaciones bacterianas con propiedades potencialmente antiinflamatorias como los géneros *Desulfovibrio*, *Bifidobacterium* y *Faecalibacterium*; (iii) producción de butirato como fuente energética para los colonitos y reducción del pH colónico, lo que favorece la absorción de minerales y reduce la toxicidad de los ácidos biliares (Bruno-Barcena & Azcarate-Peril, 2015). Otros efectos menos estudiados de los GOS y relacionados con su habilidad de modular la microbiota intestinal serían la prevención de alergias en neonatos (dermatitis atópica), desórdenes gastrointestinales (diarrea del viajero y gases) y efectos inmunomoduladores a nivel sistémico (activación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa) (Loo et al., 1999; Macfarlane et al., 2008; Lamsal, 2012)



Diseño experimental y difusión de  
resultados

*Experimental design and results  
dissemination*

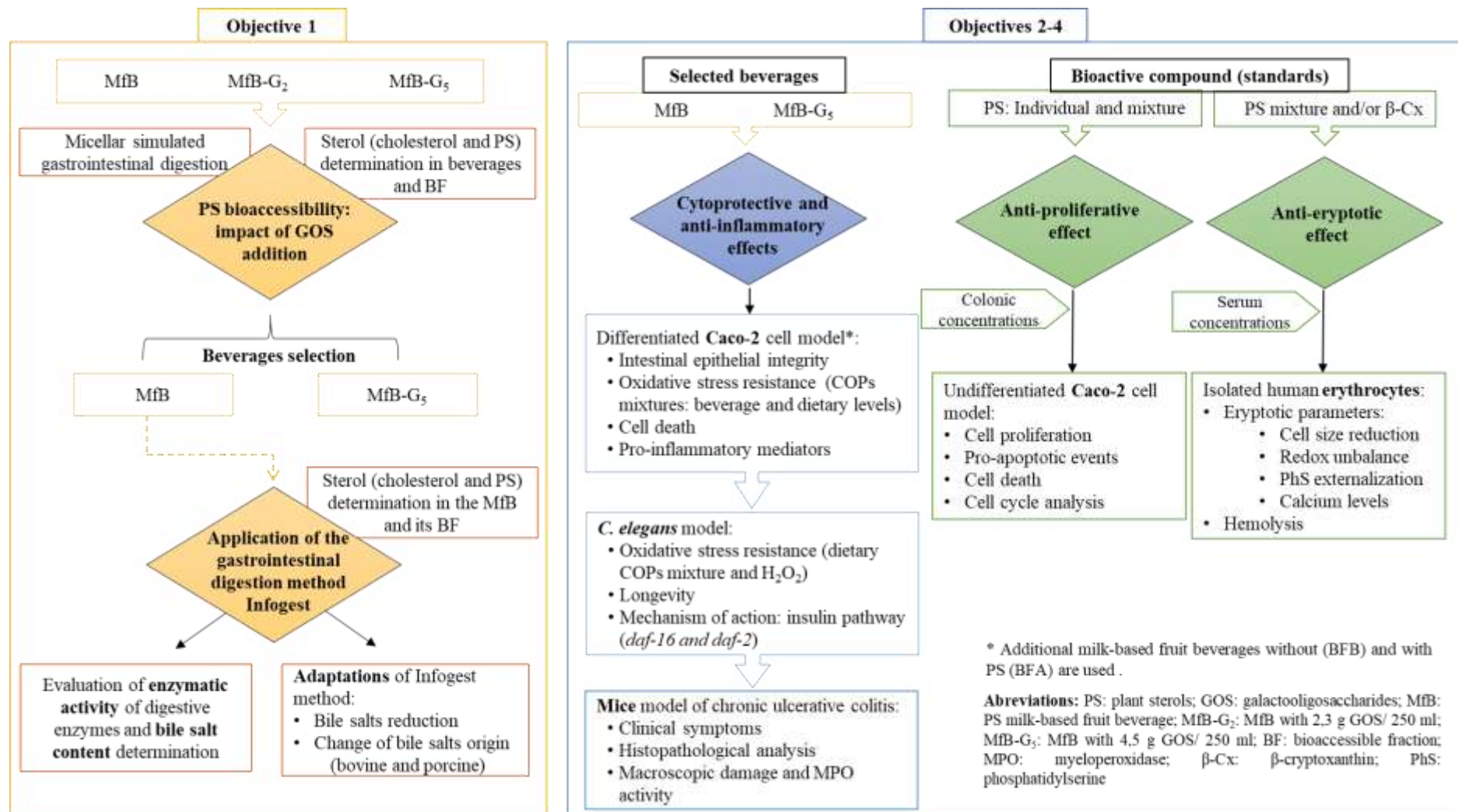




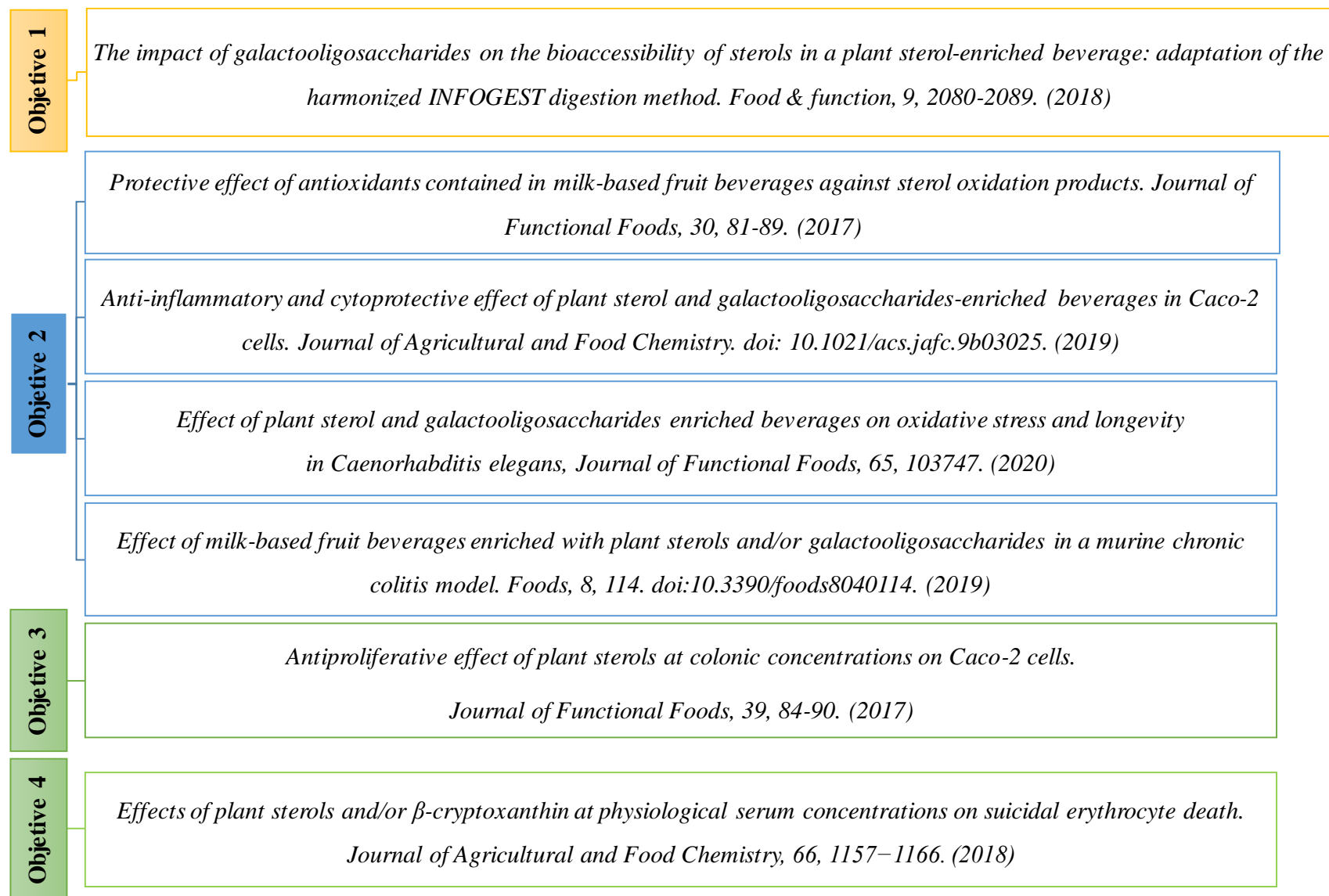


En la figura 8 y 9 se detalla el esquema del diseño experimental realizado en la Tesis Doctoral para abordar los objetivos planteados y la difusión de resultados respectivamente.

**Figure 8.** Description of the working plan followed to address the objectives of this Doctoral Thesis



**Figure 9.** Dissemination of results



Resultados y discusión

*Results and discussion*





According to the objectives mentioned above and the articles published (see annexe I), the summary of results and discussion of the present Doctoral Thesis is shown below. The methodology applied in all studies is described in the corresponding articles.

## **Objective 1**

### ➤ *Effect of galactooligosaccharides addition to plant sterol enriched milk-based fruit beverages on sterol bioaccessibility*

In this study, three plant sterols (PS)-enriched milk-based fruit beverages (2.5 g PS/ 250 mL) elaborated under the same conditions are used: MfB, without galactooligosaccharides (GOS), MfB-G<sub>2</sub> and MfB-G<sub>5</sub> with the addition of GOS at 2.3 and 4.5 g/250 mL beverage respectively. The beverages contained skimmed milk, milk fat, whey protein concentrate enriched with milk fat globule membrane (MFGM), mandarin juice from concentrate, banana puree and microencapsulated free microcrystalline PS from tall oil in a powder form. Sterol bioaccessibility in samples is evaluated using a simulated micellar gastrointestinal digestion based on three phases (salivary, gastric and intestinal) and measuring the sterol content in the bioaccessible fractions (BFs).

The cholesterol contents in beverages range between 13-13.5 mg/100 g, which are higher than reported by Alemany et al. (2013) in two similar milk-based fruit beverages with or without added mandarin juice (1.4 and 2.0 mg/100 g). The enrichment with milk fat and MFGM in our beverages would explain the higher content observed, since the latter ingredient is a source of cholesterol containing 300 mg/100 g (Yao et al., 2016). The total PS content in the three beverages range from 846 to 931 mg/100 g, being the order of abundance similar in all beverages:  $\beta$ -sitosterol  $\approx$  80%, sitostanol  $\approx$  12%, campesterol  $\approx$  7%, campestanol  $\approx$  1% and stigmasterol  $\approx$  0.7%. These results are in agreement with the specified legislation for milk-based fruit drinks with added phytosterols/phytosteranols (Decisión 2004/336/CE) and with the relative PS abundance reported in previous studies by our research group in similar beverages enriched with the same source of PS (tall oil) (González-Larena et al., 2012; Alemany et al., 2013; Alvarez-Sala et al., 2016).

Cholesterol bioaccessibility is similar in all analysed beverages (78-85%), although a significant ( $p < 0.05$ ) increase is observed in MfB-G<sub>5</sub> (85 %). Bioaccessibility of total PS is also similar in all beverages (37%), the order being campestanol ( $\approx$ 43%) > sitostanol–campesterol ( $\approx$ 40%) >  $\beta$ -sitosterol ( $\approx$ 37%) > stigmasterol ( $\approx$ 33%). No statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) are observed in the bioaccessibility of individual PS between beverages with or without GOS, except for campestanol, whose bioaccessibility is slightly lower in MfB-G<sub>5</sub> (41% vs. 43%). These results

therefore indicate that GOS addition to milk-based fruit beverages does not affect sterol solubility. As far as we know, only the effect of dietary fibre addition into foods on cholesterol bioaccessibility has been investigated. In agreement with our results, Hur et al. (2009) reported that the incorporation of soluble (pectin) and insoluble (cellulose and chitosan) fibres to beef patties at 0.5 % (w/w) do not produce a statistically significant change of cholesterol bioaccessibility, although a lower fatty acid hydrolysis rate is observed. In contrast, Minekus et al. (2005) indicate that partially hydrolysed guar gum addition at concentrations of 3% and 6% (w/v) to a yogurt drink with 3% sunflower oil and 4% egg yolk reduces cholesterol bioaccessibility 8- and 22-fold, respectively, in a multi-compartmental gastrointestinal tract model. In pork patties added with 10% of various fibre-rich extracts, cholesterol solubility in the oil phase is reduced (10–31%) after Infogest gastrointestinal digestion (López-Marcos et al., 2015).

However, the cholesterol-fibre ratio, and not only fibre content, must be taken into account. Foods with ratios between 0.005-0.01 show a cholesterol solubility or bioaccessibility reduction after fibre addition (López-Marcos et al., 2015; Minekus et al., 2005), while a ratio of 0.1 do not have a significant ( $p>0.05$ ) effect on cholesterol bioaccessibility (Hur et al., 2009). In the present study, MfB-G<sub>2</sub> and MfB-G<sub>5</sub> show a sterol-GOS ratio of 0.98 and 0.6 respectively, which is higher to the ratio reported without effect (0.1) by other authors. Therefore, due to PS enrichment it is probable that the fibre content present in the beverages is not enough to produce significant modifications in sterol bioaccessibility.

➤ *Sterol bioaccessibility by Infogest gastrointestinal digestion method: application and adaptation for PS-enriched milk-based fruit beverages*

A static harmonised method developed within the COST Action Infogest has been proposed in order to consolidate conditions for the simulated digestions of food (Minekus et al., 2014). Because the presence of GOS do not modify sterol bioaccessibility, Infogest method is only applied to the MfB beverage in order to adapt the harmonised method to assay sterol bioaccessibility in these food matrices and comparing it with the micellar digestion previously mentioned.

One of the main features of this harmonised method is the addition of enzymes during the gastrointestinal digestion based on their activity, which allows the comparison of studies. The enzymatic activity must be determined following the protocols described by Minekus et al. (2014) supplementary material. However, studies describing the specific activity of enzymes and bile salt content are scarce. In our study, human salivary  $\alpha$ -amylase shows an enzymatic activity ( $62 \pm 3.5$  U/mg) similar to that reported by Rodrigues et al. (2016) (79 U/mg). The pepsin activity ( $3326 \pm 172$  U/mg) is in agreement with a recent inter-laboratory trial within the INFOGEST network (Egger et

al., 2016), which indicate the average pepsin activity to be  $2976 \pm 591$  U/mg. Regarding enzymes implied in the intestinal phase, most studies use pancreatin instead of individual intestinal enzymes, since it is widely employed in the literature and is less costly than individual enzymes. It is important to highlight that the low lipase activity ( $50 \pm 1.1$  U/mg) measured in our study is not enough to achieve 2000 U/ml in the intestinal final mixture required by the Infogest method; the lipase enzyme appears to be poorly soluble in intestinal fluid conditions. For that reason, pancreatin is added to the digestion based on its trypsin activity (using tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME) as substrate) in order to achieve 100 U TAME/ml of intestinal digestion. Rodrigues et al. (2016) indicate that pancreatin exhibits 17 U TAME/mg which is 2.4-fold higher than our results (7.1 U TAME/mg), probably due to the different pancreatin batches used.

Cholesterol cannot be quantified in the BF because its content in the blank digestion and MfB are similar. The results suggest that high cholesterol contribution by porcine bile salts could saturate the micelles, reducing cholesterol solubilisation. Also, the presence of PS in the BF possibly could result in a competition with cholesterol, contributing to impede cholesterol incorporation into the micelle (Mel'nikov et al., 2004; Jesch & Carr, 2006). In contrast to our results, López-Marcos et al. (2015) are able to quantify cholesterol content in BFs after applying the gastrointestinal Infogest method to pork patties. This could be explained by a higher initial cholesterol content in the sample or the use of fresh bile instead of powdered bile extract. The total PS content in the BF (128 mg per 100 g beverage) using the Infogest method is 61% lower than that obtained using the micellar gastrointestinal method (330 mg per 100 g beverage). Individual PS bioaccessibility by the Infogest method is similar in all PS analysed – the order being sitostanol (16%) >  $\beta$ -sitosterol (14%) > campesterol–campestanol–stigmasterol (13%). The solubility profile differs from that obtained in micellar gastrointestinal digestion, since campestanol and campesterol show the greatest bioaccessibility. Total PS bioaccessibility by the Infogest method is clearly lower (14%) than that obtained by the micellar digestion method (37%). Differences observed in the PS bioaccessibility between Infogest and micellar digestions can be due to the bile salt concentrations (10 vs. 1.4 mM) and their animal origin (porcine vs. bovine). It has been reported that bile salt concentrations of 2.5–20 mg/ml inhibit pancreatic lipase because bile salts displace the enzyme and hinder its contact with the substrate (Li et al., 2011). Perhaps, the high bile salt concentration used in Infogest digestion could explain the low PS bioaccessibility observed with respect to micellar digestion. On the other hand, the origin of the bile salt extract largely determines the composition of bile acids. The different polarity of the bile salts greatly influences sterol micellar solubility (Armstrong & Carey, 1987; Matsuoka et al., 2008). In this sense, due to the lack of knowledge of the exact composition of the

bile salts it is not possible to explain the differential effects they may exert on sterol bioaccessibility in the two digestion methods.

In order to adapt the Infogest method for the determination of cholesterol in the BF two options are tested: the reduction of the concentration of porcine bile salts used in the Infogest method to the same concentration used in micellar digestion (1.4 mM) (option 1) or a change in bile salt origin (bovine instead of porcine), keeping the concentration (10 mM) (option 2). The results shows that option 1 and 2 allow cholesterol quantification in BF, its content being 8 and 5 mg per 100 g of beverage, and with bioaccessibilities of 62% and 38%, respectively. Regarding PS, the reduction of bile salt concentration increased the solubility of individual (18-25%) and total PS (22 %) with respect to the Infogest method carried out with porcine bile salts (13-16% and 14 %, respectively). In contrast, the change of porcine for bovine bile salts do not produce any statistically significant ( $p>0.05$ ) of PS bioaccessibility (10-16 %), with the exception of stigmaterol, which decrease 24 %. Therefore, although the change in bile salt origin allows cholesterol quantification, only a decrease in bile salt concentration favour sterol bioaccessibility. The differences observed between the Infogest method (options 1 and 2) and micellar digestion on sterol bioaccessibility indicate that other factors apart from bile salts must be considered. One possible factor could be the absence in Infogest method of lipid enzymes such as cholesterol esterase, phospholipase A2 and co-lipase, which has been positively correlated with better carotenoid and sterol (cholesterol and  $\beta$ -sitosterol) micellarisation (Richmond et al., 2001; Nik et al., 2011; Estévez-Santiago et al., 2016).

The results derived from the objective 1 have been published in: Blanco-Morales, V\*, **López-García, G\***, Cilla, A., Garcia-Llatas, G., Barberá, R., Lagarda, M. J., Sánchez-Siles, L., & Alegría, A. (2018). *The impact of galactooligosaccharides on the bioaccessibility of sterols in a plant sterol-enriched beverage: adaptation of the harmonized INFOGEST digestion method*. Food & Function, 9, 2080-2089. \*These authors have contributed equally and must be considered as first authors.

## **Objective 2**

- *Cytoprotective and anti-inflammatory effects of plant sterols enriched milk-based fruit beverages with/without galactooligosaccharides in intestinal cells*

For this study, two milk-based fruit beverage groups with similar ingredients and nutritional profiles are formulated. For the co-incubation assays two beverages, without (BFB) and with PS (2.0 g/250 ml) (BFA), are used while for the pre-incubation assays two PS-enriched beverages, (2.5 g/250ml) without (MfB) and with GOS (4.3 g/250ml) (MfB-G5), are prepared.



The objectives of the co-incubation assays are: (i) to evaluate the potential cytotoxic effect of the sterol oxidation products (SOPs) present in BFs (obtained using the micellar gastrointestinal digestion previously indicated) of BFA and BFB, at the end of its shelf life (6 months) in differentiated Caco-2 cells; (2) to study the cytoprotective effect of BFA and BFB against to the cytotoxic effects produced by a cholesterol oxidation products (COPs) mixture added into samples at dietary concentrations. The COPs mixture used in this study (cholestanetriol (32%), 7-ketocholesterol (29%), 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (25%) and 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (14%)) reflects the main oxysterols present in the BF of PS enriched milk-based fruit beverages (Alemany et al., 2013).

The parameters studied (cell viability, mitochondrial membrane potential, intracellular reactive oxygen species (ROS) and cell cycle) indicate that SOPs presents in the BFA and BFB do not exert a cytotoxic effect on differentiated Caco-2 cells. Furthermore, BFB reduces baseline ROS levels with respect to control cells (63%). The lack of effect of SOPs in the BFs may be due to the presence of antioxidant compounds such as total soluble polyphenols ( $222.7 \pm 19$  and  $139.1 \pm 9.2$  mg GAE / 100mL), vitamin C ( $88.3 \pm 4.7$  and  $68.2 \pm 1$ , 1 mg / 100 mL) and antioxidant capacity ( $4066 \pm 134$  vs.  $1984 \pm 95$   $\mu$ M Trolox) present in BFA and BFB, respectively. The additional effect of BFB on intracellular ROS levels could be explained due to its higher  $\beta$ -carotene content (1873 vs. 167  $\mu$ g / 100 mL beverage) and total antioxidant capacity. It is also possible that the low SOPs content in BFs ( $\sim 2$   $\mu$ M) (Alvarez-Sala et al., 2018b) is not enough to produce cellular changes because previous studies have reported that a concentration of at least 30  $\mu$ M is required to activate pro-apoptotic events in intestinal cells (Biasi et al., 2009; Vanmierlo et al., 2013). Therefore, SOPs formed in both beverages at the end of their shelf-life (6 months) do not produce any effect on differentiated Caco-2 cells, and also the antioxidant compounds of the beverages could play a cytoprotective role against oxidative damage.

Previously to the evaluation of the cytoprotective effect of beverages, the COPs mixture was tested alone (without BFs) at different concentrations (30, 60 and 120  $\mu$ M), and incubated for 24h, in order to confirm its cytotoxic effect. The COPs mixture at 30 and 60  $\mu$ M act as moderate cytotoxic agents reducing cell viability (21-23 %) through activation of the necrotic pathway (increase of necrotic cells number: 40-50 %), stimulating ROS overproduction (49-63 %) and disrupting mitochondrial membrane potential (14-18 %), as well as arresting cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (5 %) phase of the cell cycle (only for 60  $\mu$ M) vs control cells. The concentration of 120  $\mu$ M is discarded for further assays, since cellular damage resulted in drastic cell detachment. Only the co-incubation with BFB protects against the loss of viability caused by the COPs mixture at 30  $\mu$ M (8 %), although both beverages preserve the integrity of the cell monolayer (transepithelial electrical resistance, TEER),

even at high COPs concentration (60  $\mu\text{M}$ ). The evaluation of the mitochondrial membrane potential shows that both BFs completely protect against mitochondrial depolarisation; however, only the BFB protects additionally against ROS overproduction induced by the COPs mixture at 30  $\mu\text{M}$ , reaching cell control values. Simultaneously, co-incubation of the BFs avoid the entry of cells in a state of necrosis (both at 30 and 60  $\mu\text{M}$ ) and the cell arrest in the  $\text{G}_0/\text{G}_1$  phase produced by the COPs mixture at 60  $\mu\text{M}$ , with the exception of BFA where a slight increase of cells in the  $\text{G}_2/\text{M}$  phase. The positive effect of both beverages on TEER and mitochondrial depolarization could be related with the presence of vitamin C (6-11  $\mu\text{M}$ ) and total polyphenol contents (3.4-4.4  $\mu\text{g}$  GAE/ml). Previous studies report that treatment of differentiated Caco-2 cells with vitamin C (50  $\mu\text{M}$ ) (Roussi et al., 2007) or polyphenols from wine (5-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Deiana et al., 2012) help mitigate the loss of monolayer integrity and mitochondrial depolarisation through an antioxidant-dependent mechanism. On the other hand, the higher cytoprotective effect observed in BFB might be due to the higher total antioxidant capacity and  $\beta$ -carotene content in comparison to BFA which may prevent lipid peroxidation and preserve cell viability. Therefore, our findings indicate that the presence of antioxidant compounds such as vitamin C, polyphenols and carotenoids in the BFs protects against mitochondrial depolarisation, cell cycle arrest and cell death induced by the co-incubation with the COPs mixture administered at dietary concentrations (30 and 60  $\mu\text{M}$ ), although the impact of other bioactive compounds cannot be ruled out.

Given that foods are mostly helpful in disease prevention, *in vitro* studies are more appropriately carried out when cells are pre-incubated with the tested samples prior stress conditions as oppose to co-incubation during stress. For this reason, Caco-2 cells are pre-incubated with the BF of both beverages for 24 h and then subjected to an oxidative stress induced by a dietetic COPs mixture (30-60  $\mu\text{M}$  for 2-4h) containing the most common oxysterols present in processed and high cholesterol foods (7-ketocholesterol (43%), 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ epoxycholesterol (32%), 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (15%), 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholesterol (6%), and 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (4%)) (Biasi et al., 2009).

As expected, the Caco-2 cells exposed to the COPs mixture at optimised conditions (60  $\mu\text{M}/4\text{h}$ ) suffer multiple cellular damages leading to the disruption of cellular monolayer integrity (53%) and cell cycle progression (increasing 25 % of cell number in S phase) with a concomitant activation of apoptotic (2-fold in late apoptosis) and necrotic (2.5-fold) pathways in comparison to control cells. Apoptotic pathway activation is characterised by an alteration of mitochondrial membrane potential (28%), redox unbalance (increase of 55% for reduced glutathione (GSH) and 1.7-fold for ROS), and an increase of intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  levels (1.5-fold), parameters closely related with the intrinsic pathway of apoptosis. Moreover, the ROS overproduction is correlated with an increase of NADPH

oxidase 1 (NOX-1) content in cells, important enzyme involved in ROS synthesis. In agreement with our results, Biasi et al. (2009) indicated that treatment with the same COPs mixture (30 and 60  $\mu\text{M}$ ) for 24 h activated the intrinsic apoptosis pathway increasing caspase-3 activity and disturbing mitochondrial membrane potential, which led to the release of cytochrome C into cytosol in differentiated Caco-2 cells. The pro-apoptotic effect was closely related with their ability to induce NOX-1 activation and ROS overproduction.

The pre-incubation of Caco-2 cells with both beverages, independent to their GOS content, prevent completely the ROS overproduction and partially of the increase of GSH content (53-57 %) induced by COPs mixture, a fact that is correlated with the absence of NOX-1 content increase. The antioxidant compounds present in the BFs probably help to maintain basal NOX-1 level in the cells, preventing cell redox disruption. In the same line, Cilla et al. (2018b) report that pre-incubation (24 h) with BFs from tangerine or orange pulps considerably mitigated the increase of ROS induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5  $\mu\text{M}$ , 2 h) with a concomitant reduction of lipid peroxidation (intracellular malondialdehyde levels) and maintenance of cell viability. Combination of hydrophilic and lipophilic antioxidant compounds present in the samples, such as polyphenols, ascorbic acid, and carotenoids, could explain their protection against oxidative stress. In addition to the effect on the redox balance, both BFs are able to prevent some important pro-apoptotic events (mitochondrial membrane potential dissipation, elevated intracellular calcium levels, and phosphatidylserine externalisation) and the arrest in the S phase of the cell cycle that occurred after incubation with the COPs mixture. Considering that oxidative stress stimulus is an important trigger on apoptotic pathway activation and cell cycle arrest (Aw, 1999), it is likely that the ability of BFs to maintain the correct redox environment is directly involved in their cytoprotective effect against COPs.

In order to evaluate the anti-inflammatory effect of beverages in Caco-2 cells, an inflammatory model with the dietetic COPs mixture is optimized, using cytokine IL-8 as a marker. The COPs mixture at different incubation times (4 and 24h) and concentrations (30, 60 and 120  $\mu\text{M}$ ) is not able to stimulate IL-8 secretion. Treatment with individual COPs present in the mixture (equivalent proportion found in 60  $\mu\text{M}$  of COPs mixture) for 24 h fail also in IL-8 stimulation, discarding a possibly antagonistic effect between oxysterols in the COPs mixture. Discrepancies observed with respect to other authors that use the same dietetic mixture (Biasi et al., 2013; Deiana et al., 2017), may be related with cell differentiation degree of Caco-2 cells. Biasi et al. (2013) report that non-differentiated Caco-2 cells (2 days) treated with COPs as mixture (60  $\mu\text{M}$ ) or individual compounds (equivalent proportion found in the mixture) do not stimulate IL-8 production after 24 h of incubation, while in differentiated Caco-2 cells (21 days) produces an increase of IL-8 and IL-6 secretion

compared to the control. Therefore, the lower differentiation time used in our study (10 vs. 21 days) could partly explain the lack of effect observed. Alternatively, IL-1 $\beta$  is chosen as the pro-inflammatory inductor because previous studies have demonstrated their ability to increase the content of pro-inflammatory mediators such as IL-6, IL-8, prostaglandin E2, and the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation in Caco-2 cells (Van De Walle et al., 2010). Our results are in agreement with their data, confirming also that IL-1 $\beta$  at optimised conditions (1 ng/ ml for 24 h) promotes cytokines secretion (IL-8 and IL-6) through activation of the NF- $\kappa$ B pathway in differentiated Caco-2 cells. Pre-incubation with MfB is able to inhibit partially the NF- $\kappa$ B p65 subunit translocation to the nucleus (16%) and subsequently attenuate IL-8 (40%) and IL-6 (50%) overproduction induced by IL-1 $\beta$ ; however, the presence of GOS (MfB-G<sub>5</sub>) produce a different behaviour, losing their anti-inflammatory properties. Considering that both beverages offered an identical preventative effect on ROS overproduction, which triggers activation of NF- $\kappa$ B in several cell culture lines, the anti-inflammatory lacking effect observed with MfB-G suggests that the antioxidant effects are not linked with the anti-inflammatory properties in these beverages. It could be possible that the presence of GOS in BF compromises the bioaccessibility of some compounds with anti-inflammatory properties because there is evidence that soluble fibres can interact with bioactive compounds as polyphenols and carotenoids interfering with their release from the food matrix and subsequently with their biological effect (Palafox-Carlos et al., 2011). Due to the complexity of the food matrices used in the study, it is difficult to know which exact compounds are responsible for the different anti-inflammatory effect between MFB and MBF-G<sub>5</sub>. However, our study shows that addition of GOS to PS enriched milk-based fruit beverages compromises its ability to inhibit NF- $\kappa$ B signalling pathway.

The first part of this study has been published in: **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Alegría, A. (2017). *Protective effect of antioxidants contained in milk-based fruit beverages against sterol oxidation products*. *Journal of Functional Foods*, 30, 81-89.

The second part of this study has been published in: **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Alegría, A. (2019). *Anti-inflammatory and cytoprotective effect of plant sterol and galactooligosaccharides-enriched beverages in Caco-2 cells*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Doi: 10.1021/acs.jafc.9b03025 (*in press*).

➤ *Effect of plant sterol and galactooligosaccharides enriched beverages on oxidative stress and longevity in Caenorhabditis elegans*

The objective of this study is to evaluate the effect of MfB and MfB-G<sub>5</sub> on ageing and oxidative stress in *C. elegans*, using the dietetic COPs mixture at dietary concentrations (60–120  $\mu$ M, 1–24 h) as a novel oxidative stress model and to compare it with the well-known H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model. Moreover, the

potential implication of insulin/insulin-like growth factor pathway (IIGP) in the effect of beverages is also evaluated, using *daf-16* and *daf-2* mutant strains. Our results show a high difference in nematode susceptibility against COPs mixture depending on adult age of *C. elegans*. 5 day old adults are completely resistant to COPs action at all conditions assayed, while young adults (1 day) suffer a drastic survival reduction (40–82% vs. control). This last effect could be related with its immature antioxidant defence system, in particular, the low catalase expression during early adulthood (29 vs. 80 U/mg protein in 5 and 15-days adults, respectively) (Vanfleteren, 1993). Only one study has reported that acute exposition (96 h) to 7-ketocholesterol (60–480  $\mu$ M) (main oxysterol contained in our mixture) did not produce any effect on *C. elegans* survival, and only a slight lifespan shortening at 120–480  $\mu$ M was observed (Zong et al., 2014). However, a very short incubation time (30 min) with 7-ketocholesterol (120–480  $\mu$ M) induced a strong ROS overproduction (~3.5 to 7-fold vs. control), corroborating the pro-oxidant effect observed in our study in Caco-2 cells and in previously reports using intestinal cells (Biasi et al., 2009; Deiana et al., 2012). Therefore, the COPs mixture produces a cytotoxic effect mediated probably by oxidative stress in *C. elegans* similarly to that observed in human cell lines, although further studies that confirm other biochemical and functional changes are needed.

A known mutant strain susceptible to oxidative stress such as *daf-16* mutant strain is exposed to the COPs mixture at conditions that produced the highest effect and the lowest variability on wild-type nematodes (90  $\mu$ M/2h). DAF-16 is a transcription factor which promotes gene expression of antioxidant enzymes such as glutathione-S-transferases, catalase and the superoxide dismutase, as well as enzymes involved in the detoxification of xenobiotics (cytochrome p450) (Lapierre & Hansen, 2012). Surprisingly, the *daf-16* mutant strain is completely resistant to the COPs action, despite being a susceptible oxidative stress strain. Therefore, it seems that DAF-16 transcription factor is required for the toxic effect of COPs mixture in *C. elegans*. We hypothesize that the wild-type strain could metabolize COPs through cytochrome p450 complex giving rise to harmful cholesterol metabolites, whilst the unchanged COPs mixture could be harmless in *C. elegans*. Previous studies indicate that *C. elegans* is able to chemically modify cholesterol via the cytochrome p450 complex, as well as via 7-desaturase and  $\Delta 5$ - $\Delta 4$  isomerase enzymes, into cholesterol metabolites (i.e. dafachronic acids or 4 $\alpha$ -methylsterols) (Chitwood, 1999; Liu & Hekimi, 2013). The low expression of cytochrome p450 in the *daf-16* mutant strain could explain the lack of effect (Iser et al., 2011).

Regarding the protective effect of MfB and MfB-G<sub>5</sub> on oxidative stress induced by the COPs mixture (90  $\mu$ M/2h); results in *C. elegans* are in agreement with those obtained in Caco-2 cells. Pre-treatment with both beverages at 0.005-0.01% (v/v) confers resistance against acute oxidative stress

induced by the COPs mixture recovering nematode survival by 12-17 %, and GOS addition does not provide additional protection in wild-type *C. elegans*. The antioxidant effect at these concentrations is close to that obtained for vitamin C at 30 µg/ml (16%). At higher doses (0.025 and 0.25%, v/v) MfB completely lost its ability to confer protection against oxidative stress, while for MfB-G<sub>5</sub> a notable reduction is observed (4–6% vs. stress control). Results under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stress (2mM/5h) are similar to those obtained with COPs mixture (11-26%); lower doses (0.005–0.01%, v/v) are more effective than higher doses (0.025–0.05%, v/v), and 0.01% is the optimal dosage for both beverages and models. However, nematodes fed with MfB-G show an additional protection against oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Subsequent experiments using *daf-16* strain (under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stress), reveals that MfB confers resistance to oxidative stress completely through transcription factor DAF-16, while the presence of GOS promoted a positive effect on nematode survival via a DAF-16 independent mechanism. Probably, the extra effect observed with MfB-G under stress conditions could be due to this additional pathway. As far as we know, there are no studies that investigate the effect of GOS or other soluble fibre on oxidative stress resistance on *C. elegans*; thus further experiments are needed to elucidate the molecular pathways involved. In addition to the protection to oxidative stress, the potential effect of beverages on wild-type and mutant strains (*daf-16* and *daf-2*) nematode longevity is evaluated by using manual and automatic methods. The treatment of wild-type strain with a 1% (v/v) of MfB and MfB-G<sub>5</sub> significantly increases ( $p < 0.0001$ ) nematode lifespan by 33 and 19-27%, respectively, with a very good concordance between manual and automatic methods.

To test if beverages extend lifespan through activation of the transcription factor DAF-16, the mutant strain is exposed to each beverage at the optimal dosage (1%, v/v) observed in the wild-type strain. MfB and MfB-G did not extend nematode mean lifespan in *C. elegans*, showing similar or even lower values (11–13 and 11–12 days, respectively) than control (13 days), independently to the method used. In order to confirm the direct implication of IIGP pathway on DAF-16 activation, a *daf-2* mutant strain is used. This mutant strain lacks the *daf-2* gene which encodes the insulin/IGF-1 receptor and hence has a suppressed IIGP pathway, leading to an over-translocation of DAF-16 transcription factor into the nucleus and expression of genes related with longevity (Lapierre & Hansen, 2012). Our results indicate that nematodes fed with both beverages do not extend the longevity of the *daf-2* mutant strain showing lower mean lifespan values (29 and 28 days for MfB and MfB-G, respectively) than control (40 days), and suggesting that activation of DAF-16 transcription factor induced by beverages depends on inhibition of IIGP.

Some bioactive compounds present in the beverages as PS or derived-from mandarin juice could be involved in the promotion of oxidative stress resistance and longevity in *C. elegans*. Compounds structurally similar to PS such as diosgenin (12-120  $\mu\text{M}$ ) (Shanmugam et al., 2017) and withanolide A (2-50  $\mu\text{M}$ ) (Akhoon et al., 2016) show positive effects on resistance against oxidative stress induced by oxidising agents (juglone o paraquat) at similar concentrations as in our *C. elegans* study (70-140  $\mu\text{M}$ , corresponding to 0.005 and 0.01 %, v/v). In addition to PS action, the presence of  $\beta\text{-Cx}$  in the beverages could contribute to the protection observed against oxidative stress. Similar to our results, Llopis et al. (2019) reports that low doses of  $\beta\text{-Cx}$  (0.025  $\mu\text{g/ml}$ ) help to defend against oxidative stress produced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  in *C. elegans*, but higher (0.05–0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) or very low doses (0.005–0.01  $\mu\text{g/ml}$ ) are ineffective. This phenomenon is also observed with our beverages, where the most effective action was produced at an intermediate dose (0.01%, v/v). Interestingly, the most effective dose of  $\beta\text{-Cx}$  (0.025  $\mu\text{g/ml}$ ) reported by authors is very similar to the  $\beta\text{-Cx}$  content present in our beverages at 0.01% (v/v) (0.020  $\mu\text{g}$   $\beta\text{-Cx}$  /ml). Therefore, PS and  $\beta\text{-Cx}$  present in our beverages could be involved in the higher resistance to oxidative stress observed, as well as the potential implication of insulin/ IGF-1 pathway and *daf-16* in their beneficial effects.

The results obtained in this study have been published in: **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Genovés, S., Martorell, P., Alegría, A. (2020). *Effect of plant sterol and galactooligosaccharides enriched beverages on oxidative stress and longevity in Caenorhabditis elegans*. Journal of Functional Foods, 65, 103747.

➤ *Effect of a milk-based fruit beverage enriched with plant sterols with/without galactooligosaccharides in a murine chronic colitis model*

To complement the studies in Caco-2 and *C. elegans*, the anti-inflammatory effect of MfB and MfB-G<sub>5</sub> is tested in a chronic colitis murine model induced by dextran sulphate sodium (DSS), which mimics some important aspects of ulcerative colitis (UC) in humans. For this purpose, C57BL/6 mice (female) were orally administrated every day during 56 days with 0.15 ml of MfB or MfB-G<sub>5</sub> to achieve 35 and 95 mg/Kg body weight for PS and GOS respectively, extrapolated human dosage being 2.5 and 4.5 g/day. Chronic colitis was performed by repeated cycles of 2% DSS (w/v) in drinking water for 7 days for a total of 4 cycles.

The daily administration of MfB results in a significant ( $p < 0.05$ ) reduction (24-67 %) of the symptoms associated to UC (evaluated as disease activity index, DAI) in comparison to DSS group, mainly preventing the presence of diarrhoea or alleviating its increase during all experiment, as well as, protecting against the presence of bloody faeces in the acute phase of the disease (first DSS cycle). Reduction of clinical symptoms led to the partial prevention of colon shortening induced by DSS

cycles, showing longer colons (18%) compared to DSS group. Histopathological analysis of the colon reveals a slight improvement in the architecture of the colonic epithelium and a greater number of crypts compared to the DSS group, in agreement with the previous parameters mentioned (DAI and colon shortening). However, the distribution and morphology of the crypts remained altered, as well as an increase of neutrophil infiltration and a high myeloperoxidase (MPO) level in colonic tissue. Stimulation of neutrophil activity or its migration into colon tissue could be related with a repair mechanism that would help to the prevention of colon shortening observed after MfB treatment. The beneficial effect of MfB on colon epithelial architecture corroborates our previous results in Caco-2 cells. It is possible that the ability of MfB to inhibit some important pro-apoptotic events and of maintaining cellular redox balance and cell monolayer integrity may help counteract the cytotoxic effect of DSS.

It is important to note that our study design does not allow knowing which bioactive compounds contained in the beverages have the anti-inflammatory effect on DSS-induced colitis. Nevertheless, it may be possible that the specific combination of all of them produce the effect observed in our study. The presence of mandarin juice (represents almost half of MfB composition), could contribute to the anti-inflammatory effect since it contains flavonoids such as herperidin or narirutin, which prevent the colonic pathological tissue damage induced by trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS), through suppression of NF- $\kappa$ B pathway and restoring the redox balance (Fusco et al., 2017). On the other hand, the presence of  $\beta$ -Cx could contribute to the beneficial effects of the MfB, since its daily administration (~2.5–7.5 mg/kg/day) attenuates the lipotoxicity-induced inflammation by preventing hepatic tissue peroxidation and stimulating the expression of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) in the liver in steatohepatitis and in insulin resistance murine models (Kobori et al., 2014; Sahin et al., 2017). Taking into account that oxidative stress has a pivotal role in UC, daily administration of MfB containing  $\beta$ -Cx (0.02 mg/kg/day) could help to mitigate the pro-inflammatory process. Additionally, the enrichment of MfB with PS could be a remarkable factor in its anti-colitic effect since several studies using PS standard solutions ( $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and  $\gamma$ -oryzanol) added to animal feed and administered at doses between 20–50 mg/kg/day (similar to our study 35 mg/kg/day) for 3-56 days shows similar beneficial effects on clinical symptoms, colon shortening and colonic tissue damage independently of the colitis animal model used (Islam et al., 2008; Lee et al., 2012; Kim et al., 2014). In contrast to our results, authors also reported positive effects on the pro-inflammatory process by reducing MPO activity and important inflammatory mediators such as NF- $\kappa$ B transcription factor and pro-inflammatory cytokines. Maybe the presence of specific compounds in the beverages such as caseins and lactose



could mask the potential anti-inflammatory effect of PS, since it has been indicated that they can promote intestinal barrier damage and increase colonic cytokine levels (Llewellyn et al., 2018).

Regarding the potential beneficial effect of GOS on DSS-induced colitis, results show that MfB-G<sub>5</sub> administration during all the experiment does not confer additional beneficial effects with respect to MfB. In fact, the opposite effect is observed. DSS + MfB-G<sub>5</sub> mice suffered a dramatic increase of clinical symptoms from the third DSS cycle, remaining constant up to the end of the study. The other parameters evaluated show a similar trend, without protective effects on colon shortening, maintaining of epithelial colonic architecture and neutrophil infiltration (MPO levels) with respect to the DSS group. The effects of GOS and the mechanism through which they could improve UC in murine models are poorly understood and currently controversial. In a similar murine colitis model (rats) induced by TNBS (during 72 h), GOS (derived from whey and lactose) supplementation does not prevent colonic damage, immune cell infiltration or oedema (Holma et al., 2002), while in mice deficient in *smad-3* (which develop moderate colitis spontaneously), similar GOS administration reduce colitis severity and preserve colon architecture (Gopalakrishnan et al., 2012). Discrepancies observed can be due to the use of different animal models (rats or mice), colitis induction (DSS, TNBS or genetically modified animals models), GOS type (from whey or lactose), or dosage (4 vs. 5 g/Kg body weight). However, these facts do not explain the enhancing of DSS action observed with MfB-G<sub>5</sub>. Nevertheless, similar effects are observed after administration of fructooligosaccharides (FOS) to rats with colitis induced by DSS, which do not prevent colon shortening and exacerbate colon histological damage severity and MPO activity, as well as reducing crypt cell proliferation in the distal colon. Authors indicate that FOS delayed the onset of repair, promoting the harmful effect of DSS on colon epithelia (Geier et al., 2007). Other possible hypotheses could be related with the fermentation of GOS by gut microbiota in the colon, which could lead to the increase of bifidobacterial genera and the subsequent production of organic acids (Maathuis et al., 2012). It has been indicated that a quick rate of FOS fermentation in the cecum produce an overproduction of organic acids as lactic and acetic acids (Campbell et al., 1997), which can damage the intestinal epithelium, leading to an increase of colonic permeability (Ten Bruggencate et al., 2005). Then, we hypothesised that MfB-G administration could produce a change in intestinal microbiota by increasing the organic acids that produce bacteria, which could exacerbate the loss of the epithelial barrier integrity and the colonic mucosal permeability induced by DSS. Moreover, the potential inhibitory effect of GOS on the colonic repair mechanism cannot be ruled out.

The results obtained in this study have been published in: **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Alegría, A., Recio, M. C. (2019). *Effect of milk-based fruit beverages enriched with plant sterols and/or galactooligosaccharides in a murine chronic colitis model*. *Foods*, 8, 114. Doi:10.3390/foods8040114.

### **Objective 3**

➤ *Antiproliferative effect of plant sterols, at colonic concentrations, in Caco-2 cells*

The present study evaluates if the PS alone ( $\beta$ -sitosterol (115  $\mu$ M), campesterol (11  $\mu$ M), stigmasterol (6  $\mu$ M)) or as a mixture (132  $\mu$ M) (as the sum of the concentrations of each individual PS), at colonic concentrations estimated considering the content of PS present in the residue obtained after simulated gastrointestinal digestion of a milk-based fruit beverage enriched with PS (2g/250 ml) (Cuevas-Tena et al., 2018b), have an anti-proliferative effect in non-differentiated Caco-2 cells.

The treatment with  $\beta$ -sitosterol for 24-72h produce cell growth inhibition of 24-37% compared to control cells, in a time dependent manner (24, 48 and 72h). In contrast, campesterol and stigmasterol do not produce any significant ( $p>0.05$ ) effects at the different time points valuated. The PS mixture displays the greatest inhibitory effect upon cell growth with inhibition percentages of 33%, 41% and 67% at 24 h, 48 h and 72 h respectively. The trypan blue assay (viability test) reveals that only the PS mixture reduces cell viability (19-30 % vs. control) suggesting that cell growth inhibition is produced by an activation of the cell death pathways. Incubation with individual and combined PS produce a significant decrease in cell viability (MTT assay) after 24 h of exposure:  $\beta$ -sitosterol and PS mixture (57% and 59%) > campesterol (39%) > stigmasterol (13%), vs. control cells. Our results are consistent with those obtained in a previous study with Caco-2 cells (Cilla et al., 2015) in which  $\beta$ -sitosterol (6–24  $\mu$ M), campesterol (0.5–2  $\mu$ M), stigmasterol (0.125–0.5  $\mu$ M) and PS mixture (6.6–26.5  $\mu$ M) at serum concentrations decrease cell viability (21–44%) after 24 h of incubation. Similar results are also observed in another colon cancer cell line (HT-29), where  $\beta$ -sitosterol (0.6–240  $\mu$ M, incubated for 24 h) produced reductions in viability of 5–40% (Jayaprakasha et al., 2007; Jayaprakasha et al., 2010; Montserrat-de la Paz et al., 2015).

Regarding the molecular mechanism of the antiproliferative effect of PS, Caco-2 cells treated with individual PS do not produce dissipation of the mitochondrial membrane potential or changes in the intracellular ROS content, with the exception of stigmasterol (6  $\mu$ M), which induces a ROS overproduction of 92% vs. control cells. The PS mixture induces a two-fold increase in the percentage of cells with depolarised mitochondria and a synergistic effect is observed in the overproduction of

intracellular ROS (3-fold vs control). In relation to the apoptotic pathway, individual PS do not produce Caco-2 cell death, since cells remain relatively viable (80% viability) after 24 h of treatment. The PS mixture does not only result in the inhibition of cell growth but also induces cell death through necrosis (increase 3-fold necrotic cells vs. control) which explains the decrease in cell numbers observed in the anti-proliferative assay. These results are not fully concordant with those published by Cilla et al. (2015), who reported that  $\beta$ -sitosterol (12  $\mu$ M), campesterol (1  $\mu$ M), stigmasterol (0.25  $\mu$ M) and PS mixture (13.2  $\mu$ M) in Caco-2 cells produced cell death through apoptosis without activation of the necrotic pathway in any case. Moreover, the apoptotic process was characterised by an increase of mitochondrial membrane depolarisation (31–36%) (with the exception of  $\beta$ -sitosterol), followed by the overproduction of ROS (10-fold). Discrepancies observed suggest that PS exhibit a biphasic effect in Caco-2 cells, activating different molecular pathways depending on the concentration used. It seems that at low concentrations (0.25–13  $\mu$ M) apoptosis is the main pathway implicated in cell death, while at high concentrations (6–132  $\mu$ M) the apoptotic pathway is suppressed and a cytostatic effect prevails.

The potential cytostatic effect of PS is evaluated by the analysis of the cell cycle. All PS tested (individual and combined) produce a clear alteration of cell cycle phases, with significantly increase of the number of cells in phase  $G_0/G_1$ , followed by a general reduction of cells in phases  $G_2/M$  and S (except in the case of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol for the last phase). In agreement with this, Montserrat-de la Paz et al. (2015), in HT-29 cells, observe that  $\beta$ -sitosterol (100  $\mu$ M) and a PS mixture isolated from evening primrose oils (50–100 mg/mL) produce a significant increase in the cell population in phase  $G_0/G_1$ , with a simultaneous decrease in phases S and  $G_2/M$ . In contrast, Cilla et al. (2015) indicate that PS at plasma concentrations (1–13.5  $\mu$ M) increase the number of cells in the sub- $G_1$  phase (92–145%, vs control), without inducing changes in phase  $G_0/G_1$ . Only  $\beta$ -sitosterol (12  $\mu$ M) produce cell cycle arrest in phase  $G_2/M$  (16%), suggesting the activation of other cell cycle checkpoints. These differences with respect to our study can be related to the different cell death pathways observed. It seems that PS, at low concentrations, induce arrest in phase sub- $G_1$  through activation of the apoptotic pathway, while at higher concentrations PS interfere with cell proliferation, inducing arrest in phase  $G_0/G_1$ . However, it remains unclear whether PS driven cell cycle arrest is reversible (with PS removal), or whether severe cellular damage would completely and irreversibly prevent cell cycle progression. To test this, after 24h of incubation with the PS (individual and as a mixture), samples were removed and cells were incubated for an additional 24h with fresh media. Results show a complete recovery of cell cycle progression with individual PS, while cells treated with the PS mixture are unable to repair the previously induced arrest, and changes in the arrest checkpoint of the cell cycle were observed (S instead of  $G_0/G_1$ ). The results indicate that the individual

PS act as reversible cell cycle inhibitors, possibly blocking the formation of cyclin D1-CDKs 4/6 complexes or their cellular expression (involved in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> to S phase transition). However, combined PS maintains cell cycle arrest, though an increase in the number of cells in phase S is observed, suggesting that cells suffer DNA damage and attempt to activate cell repair mechanisms.

These results have been published in: **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R & Alegría, A. (2017). *Antiproliferative effect of plant sterols at colonic concentrations on Caco-2 cells*. Journal of Functional Foods, 39, 84-90.

#### **Objetivo 4**

- *Effects of plant sterols and/or β-cryptoxanthin, at physiological serum concentrations, on suicidal erythrocyte death*

The present study evaluates the pro- or anti-eryptotic and haemolytic effects of a mixture of PS (22 μM) [β-sitosterol (13 μM), campesterol (8 μM), and stigmasterol (1 μM)] and/or β-Cx (1μM) at concentrations obtained after the intake of PS-enriched milk-based fruit beverages containing β-Cx (Granado-Lorencio et al., 2014), and their cytoprotective effect against oxidative stress induced by a serum COPs mixture (7-ketocholesterol, cholestanetriol α-epoxycholesterol, and β-epoxy cholesterol, 7α-hydroxycholesterol, 7β-hydroxycholesterol) at concentrations occurring in hypercholesterolemic patients (20 μM) (Tesoriere et al., 2014) or *tert*-butyl hydroperoxide (tBOOH, 75 and 300 μM) .

The treatment of human erythrocytes with the PS mixture (48h) does not produce an eryptotic or haemolytic effect. The neutral effect observed in the eryptotic process could be related with the fact that PS incorporation into the erythrocyte membrane does not alter membrane properties such as rigidity, osmotic fragility, and deformability (Hendriks et al., 2003; de Jong et al., 2006). In contrast, β-Cx displays a marked pro-eryptotic effect through stimulation of phosphatidylserine externalisation (56%) (not mediated by the entry of Ca<sup>2+</sup> into the cell) and the depletion of intracellular GSH (10%) vs. control, without changes in ROS production. Simultaneously, β-Cx produces an increase in cell volume (143% versus control), which is associated with the activation of the haemolytic process. These results suggest that β-Cx promotes the death of erythrocytes through simultaneous eryptotic and haemolytic action. In agreement with our results, carotenoids such as fucoxanthin (50-75 μM) (Briglia et al., 2015) and retinoic acid (1-10 μM) (Niemoeller et al., 2008) produce a similar effect, triggering phosphatidylserine translocation to the cell surface and increasing the percentage of haemolytic erythrocytes, though unlike in our study, an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is also observed.

Co-incubation with the PS mixture and  $\beta$ -Cx partially protects against damage caused by  $\beta$ -Cx preventing the activation of the eryptotic and haemolytic pathways. In particular, the presence of PS mitigates the increase of erythrocytes with high cell volume by a factor of 37% with respect to  $\beta$ -Cx alone, and haemolysis values are restored to control levels. In addition, GSH depletion is restored, showing a favourable cellular response to stress induced by  $\beta$ -Cx. Therefore, PS could play a role in the maintenance of high intracellular GSH levels, and hence explain the observed protective effect.

The pro-eryptotic effect of the serum COPs mixture was also tested. Erythrocyte response against COPs mixture action, in terms of phosphatidylserine externalisation and cell volume changes, is limited and highly variable, even when the most cytotoxic COPs (7-ketocholesterol and triol at 7 and 2  $\mu$ M) present in the mixture are used in isolated form. For that reason, another well-known pro-eryptotic agent is selected (tBOOH) (Qadri et al., 2009). The PS mixture and/or  $\beta$ -Cx, are pre-incubated for 48 h and exposed to 75 or 300  $\mu$ M of tBOOH for 30 min. Under low oxidative stress conditions (75  $\mu$ M), pre-treatment with the PS mixture prevents haemolysis and the increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels completely, as well as helping to maintain cellular redox balance by reducing ROS overproduction (26 % vs tBOOH 75  $\mu$ M) and restoring GSH levels. Under high oxidative stress conditions (300  $\mu$ M), PS mixture only prevents the haemolytic effect. In general,  $\beta$ -Cx enhances haemolytic and pro-eryptotic effects induced by tBOOH at both concentrations by stimulating phosphatidylserine externalisation (3-fold vs. tBOOH 300  $\mu$ M) and depletion of intracellular GSH (1.4-fold vs. tBOOH 300  $\mu$ M). Co-incubation with both bioactive compounds, partially prevents the activation of the eryptotic process (phosphatidylserine externalization and GSH depletion) and completely prevents haemolysis induced by  $\beta$ -Cx + tBOOH at 75 and 300  $\mu$ M.

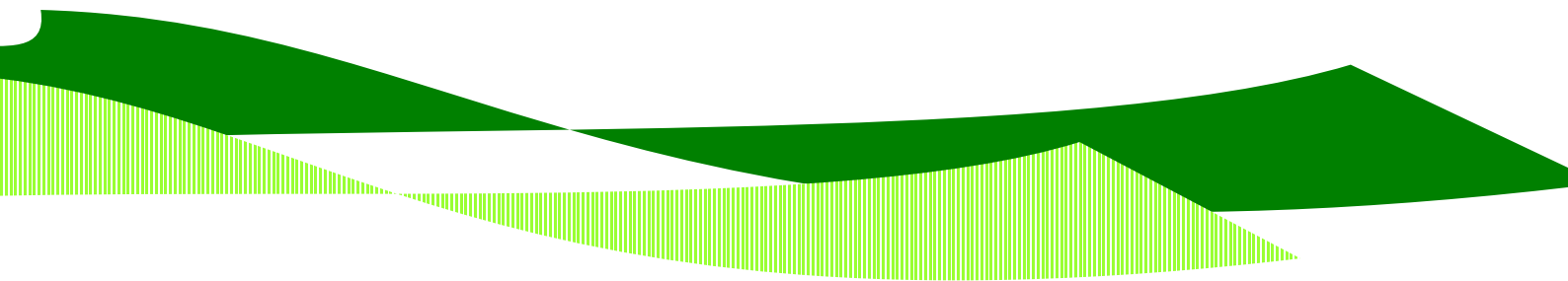
Considering the results globally, PS would help prevent the pro-eryptotic and haemolytic effect induced by  $\beta$ -Cx and hydroperoxide-induced oxidation, thereby possibly offering protection against diseases associated with eryptosis, such as anaemia, atherosclerosis, malignancy, obesity, diabetes, and chronic inflammatory diseases, among other disorders.

The results obtained has been published in: Alvarez-Sala\*, A., **López-García\***, G., Attanzio, A., Tesoriere, L., Cilla, A., Barbera, R., & Alegria, A. (2018). *Effects of plant sterols and/or  $\beta$ -cryptoxanthin at physiological serum concentrations on suicidal erythrocyte death*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66, 1157–1166. \*These authors have contributed equally and must be considered as first authors.



# Conclusiones

## *Conclusions*







Del efecto de los GOS sobre la bioaccesibilidad de los esteroides se deducen las siguientes conclusiones:

**1ª.** La adición de GOS a concentraciones de 2,3 y 4,5 g/250 ml a bebidas de zumo de frutas y leche enriquecidas en EV no modifica la bioaccesibilidad del colesterol y los EV evaluada mediante una digestión gastrointestinal simulada micelar.

**2ª.** La cuantificación de colesterol y EV en la fracción bioaccesible de la bebida enriquecida con EV obtenida tras la aplicación del método Infogest requiere utilizar sales biliares de origen bovino a la concentración propuesta por el método Infogest (10 mM) u origen porcino a la concentración del método micelar (1,4 mM).

A partir de los estudios sobre el efecto citoprotector de las bebidas objeto de estudio en modelos *in vitro* e *in vivo* se concluye:

**3ª.** Los estudios de citoprotección en células Caco-2 diferenciadas pueden llevarse a cabo tras estrés oxidativo con COPs a concentraciones presentes en la fracción bioaccesible de las bebidas objeto de estudio o a las representativas de la dieta.

**4ª.** La preincubación de células Caco-2 diferenciadas con las fracciones bioaccesibles de las bebidas previene completamente del estrés oxidativo y la activación de la apoptosis celular inducida por la mezcla de COPs dietética. En cambio, la coincubación de las fracciones bioaccesibles con la mezcla de COPs, a las concentraciones presentes en las bebidas, tiene un menor efecto sobre la activación de eventos proapoptóticos y la muerte celular.

**5ª.** Se optimiza por primera vez un modelo de estrés con la mezcla de COPs dietética, sólo efectiva en la cepa salvaje de *C. elegans*, constituyendo una alternativa al modelo convencional con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**6ª.** Se confirma el efecto citoprotector en el modelo de *C. elegans*, en el que la preincubación con las bebidas incrementa la resistencia frente al estrés oxidativo producido por los COPs y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como la longevidad del nematodo. El factor de transcripción DAF-16 puede estar directamente implicado en los efectos beneficiosos de ambas bebidas y, posiblemente, la inhibición de la ruta de la insulina.

Del efecto antiinflamatorio de las bebidas a nivel intestinal en modelos *in vitro* e *in vivo* se concluye:

**7ª.** La IL-1 $\beta$  es un modelo de inflamación adecuado en Caco-2 diferenciadas, mientras que la mezcla de COPs dietética no produce una respuesta inflamatoria.

**8ª.** Sólo la fracción bioaccesible de la bebida enriquecida con EV ejerce un efecto antiinflamatorio en células Caco-2 diferenciadas, caracterizado por la inhibición de la ruta NF- $\kappa$ B y la posterior reducción de los niveles de IL-6 e IL-8 intracelulares. Además, en modelo murino esta bebida mejora

ligeramente los síntomas clínicos de la colitis ulcerosa y previene parcialmente los daños macroscópicos. Señalar que la adición de GOS no potencia el efecto beneficioso de la bebida enriquecida con EV e incluso exacerba el proceso inflamatorio colónico.

**9ª.** El  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol o la mezcla de ellos a concentraciones colónicas, ejercen una actividad antiproliferativa en células Caco-2 no diferenciadas. Los EV individuales actúan como agentes citostáticos induciendo un bloqueo en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular, mientras que los EV combinados muestran, en general, un mayor efecto antiproliferativo y son capaces de inducir muerte celular por necrosis.

**10ª.** La mezcla de EV a concentraciones séricas, previene la hemólisis y reduce la activación de eventos proapoptóticos inducidos por la  $\beta$ -Cx con y sin estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de abordar estudios encaminados a estandarizar el método Infogest para la determinación de compuestos lipofílicos como los EV en alimentos. Así mismo, son necesarios ensayos que confirmen el posible efecto antiinflamatorio de los EV en una matriz alimentaria frente a la colitis ulcerosa.

The following conclusions are drawn from the effect of GOS on the bioaccessibility of sterols:

**1<sup>st</sup>.** The addition of GOS at concentrations of 2.3 and 4.5 g/250 ml to PS-enriched milk based fruit beverages does not modify cholesterol and the PS bioaccessibility evaluated by simulated micellar gastrointestinal digestion.

**2<sup>nd</sup>.** Quantification of cholesterol and PS in the bioaccessible fraction of the PS-enriched beverage obtained after the application of the Infogest method requires the use of bovine bile salts at the concentration proposed by the Infogest method (10 mM) or porcine bile salts at the concentration of the micellar method (1.4 mM).

Conclusions from *in vitro* and *in vivo* model studies on the cytoprotective effect of beverages are:

**3<sup>rd</sup>.** Cytoprotective studies in differentiated Caco-2 cells can be carried out after oxidative stress with COPs at concentrations present in the bioaccessible fraction of the beverages studied or those representative of the diet.

**4<sup>th</sup>.** Pre-incubation of differentiated Caco-2 cells with the bioaccessible fractions of beverages completely prevents oxidative stress and the activation of cellular apoptosis induced by the dietetic COPs mixture. In contrast, co-incubation of bioaccessible fractions with the COPs mixture, at the concentrations present in beverages, has a lower effect on the activation of pro-apoptotic events and cell death.

**5<sup>th</sup>.** A stress model using the dietetic COPs mixture in wild-type *C. elegans* is optimised for the first time. This model represents an alternative to the conventional H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model.

**6<sup>th</sup>.** The cytoprotective effect in the *C. elegans* model is confirmed, in which pre-incubation with beverages increases resistance to oxidative stress produced by COPs and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as well as an increase in nematode longevity. The transcription factor DAF-16 may be directly implicated in the beneficial effects of both beverages and possibly inhibition of the insulin pathway.

The anti-inflammatory effect of beverages at the intestinal level in *in vitro* and *in vivo* models concludes:

**7<sup>th</sup>.** IL-1 $\beta$  is a suitable inflammation model in differentiated Caco-2, while dietetic COPs mixture does not produce an inflammatory response in this model.

**8<sup>th</sup>.** Only the bioaccessible fraction of the PS-enriched beverage exerts an anti-inflammatory effect in differentiated Caco-2 cells, characterised by the inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway and the subsequent reduction of intracellular IL-6 and IL-8 levels. In addition, this beverage slightly improves

the clinical symptoms of ulcerative colitis and partially prevents macroscopic damage in the murine model. Note that the addition of GOS does not enhance the beneficial effect of the PS-enriched beverage and even exacerbates the colonic inflammatory process.

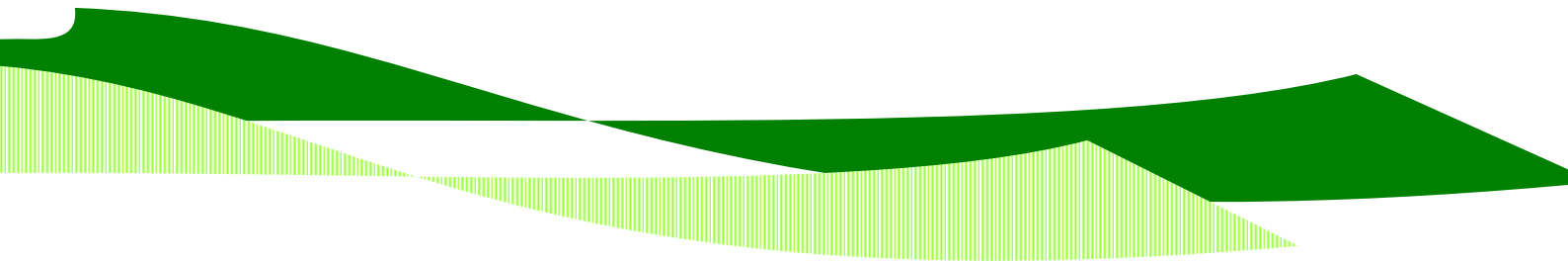
**9<sup>th</sup>.**  $\beta$ -sitosterol, campesterol and stigmasterol or their mixture at colonic concentrations exert an antiproliferative activity in undifferentiated Caco-2 cells. The individual PS act as cytostatic agents inducing a blockage in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle, while the PS mixture shows, in general, a greater antiproliferative effect and is capable of inducing cell death by necrosis.

**10<sup>th</sup>.** The PS mixture at serum concentrations prevents haemolysis and reduces the activation of proeryptotic events induced by  $\beta$ -Cx with and without oxidative stress.

The results obtained show the need to undertake studies aimed at standardising the Infogest method for the determination of lipophilic compounds such as PS in foods. Likewise, further assays are needed to confirm the possible anti-inflammatory effect of PS in a food matrix against ulcerative colitis.

# Bibliografía

## *References*





- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. E., & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2, e71.
- Akbari, P., Fink-Gremmels, J., Willems, R. H. A. M., Difilippo, E., Schols, H. A., Schoterman, M. H. C., Garssen, J., & Braber, S. (2017). Characterizing microbiota-independent effects of oligosaccharides on intestinal epithelial cells: insight into the role of structure and size. *European Journal of Nutrition*, 56, 1919–1930.
- Akhoon, B. A., Pandey, S., Tiwari, S., & Pandey, R. (2016). Withanolide A offers neuroprotection, ameliorates stress resistance and prolongs the life expectancy of *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 78, 47–56.
- Al Mijan, M., & Lim, B. O. (2018). Diets, functional foods, and nutraceuticals as alternative therapies for inflammatory bowel disease: Present status and future trends. *World Journal of Gastroenterology*, 24, 2673–2685.
- Aldini, R., Micucci, M., Cevenini, M., Fato, R., Bergamini, C., Nanni, C., Cont, M., Camborata, C., Spinozzi, S., Montagnani, M., Roda, G., D'Errico-Grigioni, A., Rosini, F., Roda, A., Mazzella, G., Chiarini, A., & Budriesi, R. (2014). Antiinflammatory effect of phytosterols in experimental murine colitis model: Prevention, induction, remission study. *PLoS ONE*, 9, e108112.
- Alegría, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static digestion models: General introduction. In Verhoeckx, K. et al. (Eds.) *The impact of food bioactives on health: In vitro and ex vivo models*. Springer International Publishing, 3–12.
- Aleman, L., Cilla, A., Garcia-Llatas, G., Rodriguez-Estrada, M. T., Cardenia, V., & Alegría, A. (2013). Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages. *Food Research International*, 52, 1–7.
- Aleman, L., Laparra, J. M., Barberá, R., & Alegría, A. (2012). Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3106–3113.
- Almero, J. (2007). Modelos experimentales *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutricion Hospitalaria*, 22, 179–189.
- Alvarez-Sala, A., Attanzio, A., Tesoriere, L., Garcia-Llatas, G., Barberá, R., & Cilla, A. (2019). Apoptotic effect of a phytosterol-ingredient and its main phytosterol ( $\beta$ -sitosterol) in human cancer cell lines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70, 323–334.
- Álvarez-Sala, A., Ávila-Gálvez, M. Á., Cilla, A., Barberá, R., Garcia-Llatas, G., Espín, J. C., & González-Sarrías, A. (2018b). Physiological concentrations of phytosterols enhance the apoptotic effects of 5-fluorouracil in colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 49, 52–60.
- Alvarez-Sala, A., Blanco-Morales, V., Cilla, A., Garcia-Llatas, G., Sánchez-Siles, L. M., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2018b). Safe intake of a plant sterol-enriched beverage with milk fat globule membrane: Bioaccessibility of sterol oxides during storage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 111–117.
- Alvarez-Sala, A., Blanco-Morales, V., Cilla, A., Silvestre, R. A., Hernández-Alvarez, E., Granado-Lorencio, F., Barberá, R., & Garcia-Llatas, G. (2018a). A positive impact on the serum lipid profile and cytokines after the consumption of a plant sterol-enriched beverage with a milk fat globule membrane: a clinical study. *Food and Function*, 9, 5209–5219.
- Álvarez-Sala, A., Cilla, A., García-Llatas, G., & Barberá-Saez, R. (2018a). *Bioavailability and biological effects of sterols in functional beverages*. Universitat de València, Valencia.

- Alvarez-Sala, A., Garcia-Llatas, G., Cilla, A., Barberá, R., Sánchez-Siles, L. M., & Lagarda, M. J. (2016). Impact of lipid components and emulsifiers on plant sterols bioaccessibility from milk-based fruit beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*, 5686–5691.
- Arends, J., Bachmann, P., Baracos, V., Barthelemy, N., Bertz, H., Bozzetti, F., Fearon, K., Hütterer, E., Isenring, E., Kaasa, S., Krznaric, Z., Laird, B., Larsson, M., Laviano, A., Mühlebach, S., Muscaritoli, M., Oldervoll, L., Ravasco, P., Solheim, T., Strasser, F., van der Schueren, M., & Preiser, J. C. (2017). ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clinical Nutrition*, *36*, 11–48.
- Armstrong, M. J., & Carey, M. C. (1987). Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *Journal of Lipid Research*, *28*, 1144–1155.
- Attanzio, A., Diana, P., Barraja, P., Carbone, A., Spanò, V., Parrino, B., Cascioferro, S. M., Allegra, M., Cirrincione, G., Tesoriere, L., & Montalbano, A. (2019). Quality, functional and sensory evaluation of pasta fortified with extracts from *Opuntia ficus-indica* cladodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*, 4242–4247.
- Aw, T. Y. (1999). Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*, *70*, 557–565.
- Awaad, A. S., El-Meligy, R. M., Al-Jaber, N. A., Al-Muteeri, H. S., Zain, M. E., Alqasoumi, S. I., Alafeefy, A. M., & Donia, A. E. R. M. (2013). Anti-ulcerative colitis activity of compounds from *Euphorbia granuleta* Forssk. *Phytotherapy Research*, *27*, 1729–1734.
- Awad, A. B., & Fink, C. S. (2000). Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, *130*, 2127–2130.
- Awad, A. B., Barta, S. L., Fink, C. S., & Bradford, P. G. (2008).  $\beta$ -Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. *Molecular Nutrition and Food Research*, *52*, 419–426.
- Awad, A. B., Chen, Y. C., Fink, C. S., & Hennessey, T. (1996).  $\beta$ -sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Research*, *16*, 2797–2804.
- Awad, A. B., Fink, C. S., Trautwein, E. A., & Ntanos, F. Y. (2005).  $\beta$ -sitosterol stimulates ceramide metabolism in differentiated Caco2 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*, 650–655.
- Awad, A. B., von Holtz, R. L., Cone, J. P., Fink, C. S., & Chen, Y. C. (1998).  $\beta$ -sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Research*, *18*, 471–473.
- Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V., Bertoli, E., & Ferretti, G. (2011). Phytosterols, phytosterols and their esters: From natural to functional foods. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, *4*, 165–172.
- Barriuso, B., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2017). Oxysterols formation: A review of a multifactorial process. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *169*, 39–45.
- Baskar, A. A., Ignacimuthu, S., Paulraj, G. M., & Al Numair, K. S. (2010). Chemopreventive potential of  $\beta$ -sitosterol in experimental colon cancer model - an *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *10*, 24–34.
- Baugreet, S., Gomez, C., Auty, M. A. E., Kerry, J. P., Hamill, R. M., & Brodkorb, A. (2019). *In vitro* digestion of protein-enriched restructured beef steaks with pea protein isolate, rice protein and lentil flour following *sous vide* processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *54*, 152–161.



- Biasi, F., Chiarpotto, E., Sottero, B., Maina, M., Mascia, C., Guina, T., Gamba, P., Gargiulo, S., Testa, G., Leonarduzzi, G., & Poli, G. (2013). Evidence of cell damage induced by major components of a diet-compatible mixture of oxysterols in human colon cancer CaCo-2 cell line. *Biochimie*, *95*, 632–640.
- Biasi, F., Mascia, C., Astegiano, M., Chiarpotto, E., Nano, M., Vizio, B., Leonarduzzi, G., & Poli, G. (2009). Pro-oxidant and proapoptotic effects of cholesterol oxidation products on human colonic epithelial cells: A potential mechanism of inflammatory bowel disease progression. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*, 1731–1741.
- Bissinger, R., Bhuyan, A. A. M., Qadri, S. M., & Lang, F. (2019). Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *FEBS Journal*, *286*, 826–854.
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Golding, M., Le Feunteun, S., Macierzanka, A., Menard, O., Miralles, B., Moscovici, A., Portmann, R., Recio, I., Rémond, D., Santé-Lhoutelier, V., Wooster, T. J., Lesmes, U., Mackie, A. R., & Dupont, D. (2018). Correlation between *in vitro* and *in vivo* data on food digestion. What can we predict with static *in vitro* digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*, 2239–2261.
- Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, C., Flourié, B., Brouns, F., & Bornet, F. R. (2004). The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *American Journal of Clinical Nutrition*, *80*, 1658–1664.
- Brahmi, F., Vejux, A., Sghaier, R., Zarrouk, A., Nury, T., Meddeb, W., Rezig, L., Namsi, A., Sassi, K., Yammine, A., Badreddine, I., Vervandier-Fasseur, D., Madani, K., Boulekbache-Makhlouf, L., Nasser, B., & Lizard, G. (2019). Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*, 3179–3198.
- Briglia, M., Calabró, S., Signoretto, E., Alzoubi, K., Laufer, S., Faggio, C., & Lang, F. (2015). Fucoxanthin induced suicidal death of human erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *37*, 2464–2475.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A. R., Martins, C., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C. N., Souchon, I., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, S. J., Weitschies, W., & Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*, 991–1014.
- Bruno-Barcena, J. M., & Azcarate-Peril, M. A. (2015). Galacto-oligosaccharides and colorectal cancer: Feeding our intestinal probiome. *Journal of Functional Foods*, *12*, 92–108.
- Brzeska, M., Szymczyk, K., & Szterk, A. (2016). Current knowledge about oxysterols: A review. *Journal of food science*, *81*, 2299–2308.
- Bustos, M. C., Vignola, M. B., Pérez, G. T., & León, A. E. (2017). *In vitro* digestion kinetics and bioaccessibility of starch in cereal food products. *Journal of Cereal Science*, *77*, 243–250.
- Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J. C., Rotllan, N., & Blanco-Vaca, F. (2008). Phytosterols do not change susceptibility to obesity, insulin resistance, and diabetes induced by a high-fat diet in mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *57*, 1497–1501.
- Campbell, J. M., Fahey, G. C., & Wolf, B. W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *The Journal of Nutrition*, *127*, 130–136.

- Carr, S. S., Hooper, A. J., Sullivan, D. R., & Burnett, J. R. (2019). Non-HDL-cholesterol and apolipoprotein B compared with LDL-cholesterol in atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment. *Pathology*, *51*, 148–154.
- Cavonius, L. R., Albers, E., & Undeland, I. (2016). *In vitro* bioaccessibility of proteins and lipids of pH-shift processed *Nannochloropsis oculata* microalga. *Food and Function*, *7*, 2016–2024.
- Chen, Q., Liu, M., Zhang, P., Fan, S., Huang, J., Yu, S., Zhang, C., & Li, H. (2019). Fucoidan and galactooligosaccharides ameliorate high-fat diet-induced dyslipidemia in rats by modulating the gut microbiota and bile acid metabolism. *Nutrition*, *65*, 50–59.
- Chitwood, D. J. (1999). Biochemistry and function of nematode steroids. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *34*, 273–284.
- Choi, Y. H., Kong, K. R., Kim, Y. A., Jung, K. O., Kil, J. H., Rhee, S. H., & Park, K. Y. (2003). Induction of Bax and activation of caspases during  $\beta$ -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, *23*, 1657–1662.
- Chonan, O., Shibahara-Sone, H., Takahashi, M. R., Masakazu, K., Ikeda, K., & Hayakawa, H. K. (2004). Undigestibility of galactooligosaccharides. *The Japanese Society for Food Science and Technology*, *51*, 28–33.
- Cilla, A., Alegría, A., Attanzio, A., Garcia-Llatas, G., Tesoriere, L., & Livrea, M. A. (2017). Dietary phytochemicals in the protection against oxysterol-induced damage. *Chemistry and Physics of Lipids*, *207*, 192–205.
- Cilla, A., Attanzio, A., Barberá, R., Tesoriere, L., & Livrea, M. A. (2015). Anti-proliferative effect of main dietary phytosterols and  $\beta$ -cryptoxanthin alone or combined in human colon cancer Caco-2 cells through cytosolic  $\text{Ca}^{+2}$  - and oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Functional Foods*, *12*, 282–293.
- Cilla, A., García-Llatas, G., Lagarda, M. J., Barberá, R., & Alegría, A. (2019). Development of functional beverages: The case of plant sterol-enriched milk-based fruit beverages. In Grumezescu, A. M. & Holban, A. M. (Eds.) *Functional and Medicinal Beverages*. (1st ed.) Elsevier, 285–312.
- Cilla, A., López-García, G., & Barberá, R. (2018a). *In vitro* bioavailability of iron and calcium in cereals and derivatives: A review. *Food Reviews International*, *34*, 1–33.
- Cilla, A., Rodrigo, M. J., Zacarías, L., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Barberá, R., & Alegría, A. (2018b). Protective effect of bioaccessible fractions of citrus fruit pulps against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Research International*, *103*, 335–344.
- Cuevas-Tena, M., Alegría, A., & Lagarda, M. (2018a). *Influence of colonic fermentation on dietary sterols*. Universitat de València, Valencia.
- Cuevas-Tena, M., Gómez del Pulgar, E. M., Benítez-Páez, A., Sanz, Y., Alegría, A., & Lagarda, M. J. (2018b). Plant sterols and human gut microbiota relationship: An *in vitro* colonic fermentation study. *Journal of Functional Foods*, *44*, 322–329.
- Cusack, L. K., Fernandez, M. L., & Volek, J. S. (2013). The food matrix and sterol characteristics affect the plasma cholesterol lowering of phytosterol/phytostanol. *Advances in Nutrition*, *4*, 633–643.
- Dai, Z., Lyu, W., Xie, M., Yuan, Q., Ye, H., Hu, B., Zhou, L., & Zeng, X. (2017). Effects of  $\alpha$ -galactooligosaccharides from chickpeas on high-fat-diet-induced metabolic syndrome in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 3160–3166.
- Daly, T. J., Aherne, S. A., O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2009). Lack of genoprotective effect of phytosterols and conjugated linoleic acids on Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 1791–1796.

Davis, L. M. G., Martínez, I., Walter, J., Goin, C., & Hutkins, R. W. (2011). Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PLoS ONE*, 6, 1–10.

de Boer, J. F., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2018). Cholesterol transport revisited: A new turbo mechanism to drive cholesterol excretion. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29, 123–133.

de Jong, A., Plat, J., & Mensink, R. P. (2006). Plant sterol or stanol consumption does not affect erythrocyte osmotic fragility in patients on statin treatment. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60, 985–990.

Decisión 2004/333/CE. Comisión de 31 de marzo de 2004 relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, aliños para ensaladas, productos de tipo leche, productos tipo leche fermentada, bebidas de soja y productos tipo queso con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea L105*, 40–42.

Decisión 2004/334/CE. Comisión de 31 de marzo de 2004 relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, productos tipo leche, productos tipo yogur y salsas aromáticas con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea L105*, 43–45.

Decisión 2004/335/CE. Comisión de 31 de marzo de 2004 relativa a la autorización de comercialización de productos tipo leche y productos tipo yogur con ésteres de fitosterol añadidos como nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea L105*, 46–48.

Decisión 2004/336/CE. Comisión de 31 de marzo de 2004 relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, bebidas de frutas a base de leche, productos tipo yogur y productos tipo queso, con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea L105*, 49–51.

Decisión 2004/845/CE. Comisión 12 de noviembre de 2004 relativa a la autorización de la comercialización de bebidas a base de leche con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevos alimentos o nuevos ingredientes, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea L366*, 14–16.

Decisión 2006/58/CE. Comisión de 24 enero de 2006 por la que se autoriza la comercialización de pan de centeno con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevos alimentos nuevos ingredientes de conformidad con el Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea L31*, 18–20.

Decisión 2006/59/CE. Comisión de 24 enero de 2006 relativa a la autorización de comercialización de pan de centeno con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevos alimentos nuevos ingredientes de conformidad con el Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea L31*, 21–23.

Decisión 2008/36/CE. Comisión 10 de enero de 2008 por la que se autoriza la comercialización de bebidas de arroz con fitosteroles o fitostanoles añadidos como nuevo alimento con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea L8*, 15–17.

Deiana, M., Calfapietra, S., Incani, A., Atzeri, A., Rossin, D., Loi, R., Sottero, B., Iaia, N., Poli, G., & Biasi, F. (2017). Derangement of intestinal epithelial cell monolayer by dietary cholesterol oxidation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 539–550.

- Deiana, M., Loru, D., Incani, A., Rosa, A., Atzeri, A., Melis, M. P., Cabboi, B., Hollecker, L., Pinna, M. B., Argiolas, F., Murru, M., & Dessì, M. A. (2012). Wine extracts from Sardinian grape varieties attenuate membrane oxidative damage in Caco-2 cell monolayers. *Food Chemistry*, *134*, 2105–2113.
- Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., l'Anson, K., & Gibson, G. R. (2008). Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, *87*, 785–791.
- Deschner, E. E., Cohen, B. I., & Raicht, R. F. (1982). The kinetics of the protective effect of  $\beta$ -sitosterol against MNU-induced colonic neoplasia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *103*, 49–54.
- Dong, Y., Guha, S., Sun, X., Cao, M., Wang, X., & Zou, S. (2012). Nutraceutical interventions for promoting healthy aging in invertebrate models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*, 718491.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M. J., Le Feunteun, S., JanssenDuijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A. R., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Murray, B. S., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C. N., Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L. E., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E. K., Vegarud, G. E., Vergères, G., & Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, *88*, 217–225.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, *35*, 495–516.
- Eriksen, J. N., Luu, A. Y., Dragsted, L. O., & Arrigoni, E. (2016). *In vitro* liberation of carotenoids from spinach and Asia salads after different domestic kitchen procedures. *Food Chemistry*, *203*, 23–27.
- Estévez-Santiago, R., Olmedilla-Alonso, B., & Fernández-Jalao, I. (2016). Bioaccessibility of provitamin A carotenoids from fruits: Application of a standardised static *in vitro* digestion method. *Food and Function*, *7*, 1354–1366.
- Feng, S., Dai, Z., Liu, A., Wang, H., Chen, J., Luo, Z., & Yang, C. S. (2017).  $\beta$ -Sitosterol and stigmasterol ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice fed a high fat Western-style diet. *Food and Function*, *8*, 4179–4186.
- Fernández, J., Moreno, F. J., Olano, A., Clemente, A., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). A galactooligosaccharides preparation derived from lactulose protects against colorectal cancer development in an animal model. *Frontiers in Microbiology*, *9*. doi:10.3389/fmicb.2018.02004.
- Furlan, C. P. B., Castro Marques, A., Marineli, R. da S., & Maróstica, M. R. (2013). Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet. *Food Research International*, *51*, 429–435.
- Fusco, R., Cirmi, S., Gugliandolo, E., Di Paola, R., Cuzzocrea, S., & Navarra, M. (2017). A flavonoid-rich extract of orange juice reduced oxidative stress in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Journal of Functional Foods*, *30*, 168–178.
- Gallego, M., Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F. (2018). Stability of the potent antioxidant peptide SNAAC identified from Spanish dry-cured ham. *Food Research International*, *105*, 873–879.
- García-Llatas, G., & Rodríguez-Estrada, M. T. (2011). Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, *164*, 607–624.

- García-Llatas, G., Mejía, E., Cilla, A., Alegría, A., & Lagarda, M. J. (2015). Estimation of plant sterol intake in a resident population of the valencian community (Spain). In Guiné, R. (Ed.) *Phytosterols. Food Sources and Chemistry of Plant Sterols and Stanols*. (1st ed.) New York: Nova Science Publishers, 185–207.
- Geier, M. S., Butler, R. N., Giffard, P. M., & Howarth, G. S. (2007). Prebiotic and synbiotic fructooligosaccharide administration fails to reduce the severity of experimental colitis in rats. *Diseases of the Colon and Rectum*, *50*, 1061–1069.
- González-Larena, M., Cilla, A., García-Llatas, G., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2012). Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: Storage stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 4725–4734.
- Gopalakrishnan, A., Clinthorne, J. F., Rondini, E. A., McCaskey, S. J., Gurzell, E. A., Langohr, I. M., Gardner, E. M., & Fenton, J. I. (2012). Supplementation with galacto-oligosaccharides increases the percentage of NK Cells and reduces colitis severity in Smad3-deficient mice. *The Journal of Nutrition*, *142*, 1336–1342.
- Granado-Lorencio, F., & Hernández-Alvarez, E. (2016). Functional foods and health effects: A nutritional biochemistry perspective. *Current Medicinal Chemistry*, *23*, 2929–2957.
- Granado-Lorencio, F., Lagarda, M. J., García-López, F. J., Sánchez-Siles, L. M., Blanco-Navarro, I., Alegría, A., Pérez-Sacristán, B., García-Llatas, G., Donoso-Navarro, E., Silvestre-Mardomingo, R. A., & Barberá, R. (2014). Effect of  $\beta$ -cryptoxanthin plus phytosterols on cardiovascular risk and bone turnover markers in post-menopausal women: A randomized crossover trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *24*, 1090–1096.
- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Pérez-Sacristán, B., Blanco-Navarro, I., & Blázquez-García, S. (2007). Comparative *in vitro* bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 6387–6394.
- Grefhorst, A., Verkade, H. J., & Groen, A. K. (2019). The TICE pathway: mechanisms and lipid-lowering therapies. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, *15*, 70–76.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, *30*, 591–600.
- Guina, T., Deiana, M., Calfapietra, S., Cabboi, B., Maina, M., Tuberoso, C. I., Leonarduzzi, G., Gamba, P., Gargiulo, S., Testa, G., Poli, G., & Biasi, F. (2015). The role of p38 MAPK in the induction of intestinal inflammation by dietary oxysterols: Modulation by wine phenolics. *Food and Function*, *6*, 1218–1228.
- Guo, W., Shu, Y., & Yang, X. (2016). Tea dietary fiber improves serum and hepatic lipid profiles in mice fed a high cholesterol diet. *Plant Foods for Human Nutrition*, *71*, 145–150.
- Gylling, H., & Simonen, P. (2015). Phytosterols, phytostanols, and lipoprotein metabolism. *Nutrients*, *7*, 7965–7977.
- Gylling, H., & Simonen, P. (2016). Are plant sterols and plant stanols a viable future treatment for dyslipidemia? *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, *14*, 549–551.
- Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H. N., Ellegård, L., Jessup, W., Jones, P. J., Lütjohann, D., Maerz, W., Masana, L., Silbernagel, G., Staels, B., Borén, J., Catapano, A. L., De Backer, G., Deanfield, J., Descamps, O. S., Kovanen, P. T., Riccardi, G., Tokgözoğlu, L., & Chapman, M. J. (2014). Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, *232*, 346–360.

- Hannun, Y. A., & Lincardic, C. M. (1993). Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. *BBA - Reviews on Biomembranes*, *1154*, 223–236.
- Hashmi, A., Naeem, N., Farooq, Z., Masood, S., Iqbal, S., & Naseer, R. (2016). Effect of prebiotic galacto-oligosaccharides on serum lipid profile of hypercholesterolemics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *8*, 19–30.
- Hendriks, H. F. J., Brink, E. J., Meijer, G. W., Princen, H. M. G., & Ntanios, F. Y. (2003). Safety of long-term consumption of plant sterol esters-enriched spread. *European Journal of Clinical Nutrition*, *57*, 681–692.
- Hernández-Hernández, O., Marín-Manzano, M. C., Rubio, L. A., Moreno, F. J., Sanz, M. L., & Clemente, A. (2012). Monomer and linkage type of galacto- oligosaccharides affect their resistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats. *The Journal of Nutrition*, *142*, 1232–1239.
- Hernot, D. C., Boileau, T. W., Bauer, L. L., Middelbos, I. S., Murphy, M. R., Swanson, K. S., & Fahey, G. C. (2009). *In vitro* fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 1354–1361.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, *96*, 736–749.
- Holma, R., Juvonen, P., Asmawi, M. Z., Vapaatalo, H., & Korpela, R. (2002). Galacto-oligosaccharides stimulate the growth of bifidobacteria but fail to attenuate inflammation in experimental colitis in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *37*, 1042–1047.
- Huang, J., Xu, M., Fang, Y. J., Lu, M. S., Pan, Z. Z., Huang, W. Q., Chen, Y. M., & Zhang, C. X. (2017). Association between phytosterol intake and colorectal cancer risk: A case-control study. *British Journal of Nutrition*, *117*, 839–850.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, *125*, 1–12.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Park, G. B., & Joo, S. T. (2009). Effects of various fiber additions on lipid digestion during *in vitro* digestion of beef patties. *Journal of Food Science*, *74*, 653–657.
- Iaccarino, N., Amato, J., Pagano, B., Di Porzio, A., Micucci, M., Bolelli, L., Aldini, R., Novellino, E., Budriesi, R., & Randazzo, A. (2019). Impact of phytosterols on liver and distal colon metabolome in experimental murine colitis model: an explorative study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *34*, 1041–1050.
- Ikeda, I. (2015). Factors affecting intestinal absorption of cholesterol and plant sterols and stanols. *Journal of Oleo Science*, *64*, 9–18.
- Iser, W. B., Wilson, M. A., Wood, W. H., Becker, K., & Wolkow, C. A. (2011). Co-regulation of the Daf-16 target gene, *cyp-35b1/dod-13*, by Hsf-1 in *C. elegans* dauer larvae and *daf-2* insulin pathway mutants. *PLoS ONE*, *6*, e17369.
- Islam, M. S., Murata, T., Fujisawa, M., Nagasaka, R., Ushio, H., Bari, A. M., Hori, M., & Ozaki, H. (2008). Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *British Journal of Pharmacology*, *154*, 812–824.
- Jakulj, L., van Dijk, T. H., de Boer, J. F., Kootte, R. S., Schonewille, M., Paalvast, Y., Boer, T., Bloks, V. W., Boverhof, R., Nieuwdorp, M., Beuers, U. H. W., Stroes, E. S. G., & Groen, A. K. (2016). Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion. *Cell Metabolism*, *24*, 783–794.

- Jan, R., & Chaudhry, G. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9, 205–2018.
- Janezic, S. A., & Rao, A. V. (1992). Dose-dependent effects of dietary phytosterol on epithelial cell proliferation of the murine colon. *Food and Chemical Toxicology*, 30, 611–616.
- Jayaprakasha, G. K., Jadegoud, Y., Nagana Gowda, G. A., & Patil, B. S. (2010). Bioactive compounds from sour orange inhibit colon cancer cell proliferation and induce cell cycle arrest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 180–186.
- Jayaprakasha, G. K., Mandadi, K. K., Poulose, S. M., Jadegoud, Y., Nagana Gowda, G. A., & Patil, B. S. (2007). Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 4923–4932.
- Jesch, E. D., & Carr, T. P. (2006). Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. *Nutrition Research*, 26, 579–584.
- Jiang, L., Zhao, X., Xu, J., Li, C., Yu, Y., Wang, W., & Zhu, L. (2019). The protective effect of dietary phytosterols on cancer risk: A systematic meta-analysis. *Journal of Oncology*, 2019, 7479518.
- Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A. B., & Saura-Calixto, F. (2006). Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3462–3471.
- Kamp, K., Dudley-Brown, S., Heitkemper, M., Wyatt, G., & Given, B. (2019). Symptoms among emerging adults with inflammatory bowel disease: a descriptive study. *Research in Nursing and Health*, 43, 48–55.
- Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 152, 313–321.
- Kaptoge, S., Pennells, L., De Bacquer, D., Cooney, M. T., Kavousi, M., Stevens, G., Riley, L. M., Savin, S., Khan, T., Altay, S., Amouyel, P., Assmann, G., Bell, S., Ben-Shlomo, Y., Berkman, L., Beulens, J. W., Björkelund, C., Blaha, M., & Blazer, D. G. (2019). World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *The Lancet Global Health*, 7, 1332–1345.
- Katz, O., Reifen, R., & Lerner, A. (2014).  $\beta$ -Carotene can reverse dysregulation of iron protein in an *in vitro* model of inflammation. *Immunologic Research*, 61, 70–78.
- Kim, K. A., Lee, I. A., Gu, W., Hyam, S. R., & Kim, D. H. (2014).  $\beta$ -Sitosterol attenuates high-fat diet-induced intestinal inflammation in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 in the NF- $\kappa$ B pathway. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58, 963–972.
- Kobori, M., Ni, Y., Takahashi, Y., Watanabe, N., Sugiura, M., Ogawa, K., Nagashimada, M., Kaneko, S., Naito, S., & Ota, T. (2014).  $\beta$ -cryptoxanthin alleviates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by suppressing inflammatory gene expression in mice. *PLoS ONE*, 9, e98294.
- Koch, K., Havermann, S., Büchter, C., & Wätjen, W. (2014). *Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: Effects of flavonoids on redox-sensitive signalling pathways and ageing. *Scientific World Journal*, 2014, 920398.
- Krumbeck, J. A., Rasmussen, H. E., Hutkins, R. W., Clarke, J., Shawron, K., Keshavarzian, A., & Walter, J. (2018). Probiotic *Bifidobacterium* strains and galactooligosaccharides improve intestinal barrier function in obese adults but show no synergism when used together as synbiotics. *Microbiome*, 6, 121–137.
- Lagarda, M. J., García-Llatas, G., & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1486–1496.

- Lamsal, B. P. (2012). Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2020–2028.
- Lang, E., & Lang, F. (2015). Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: The suicidal erythrocyte death. *BioMed Research International*, 2015, 513518.
- Lang, F., Abed, M., Lang, E., & Föller, M. (2014). Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21, 138–153.
- Lapierre, L. R., & Hansen, M. (2012). Lessons from *C. elegans*: Signaling pathways for longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23, 637–644.
- Laurell, A., & Sjöberg, K. (2017). Prebiotics and synbiotics in ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52, 477–485.
- Lee, I. A., Kim, E. J., & Kim, D. H. (2012). Inhibitory effect of  $\beta$ -sitosterol on TNBS-induced colitis in mice. *Planta Medica*, 78, 896–898.
- Li, Y., Hu, M., & McClements, D. J. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, 126, 498–505.
- Lin, J., & Hackam, D. J. (2011). Worms, flies and four-legged friends: The applicability of biological models to the understanding of intestinal inflammatory diseases. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 4, 447–456.
- Liu, C., Lin, X. L., Wan, Z., Zou, Y., Cheng, F. F., & Yang, X. Q. (2016a). The physicochemical properties: *in vitro* binding capacities and *in vivo* hypocholesterolemic activity of soluble dietary fiber extracted from soy hulls. *Food and Function*, 7, 4830–4840.
- Liu, F., Li, P., Chen, M., Luo, Y., Prabhakar, M., Zheng, H., He, Y., Qi, Q., Long, H., Zhang, Y., Sheng, H., & Zhou, H. (2017). Fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) increase *Bifidobacterium* but reduce butyrate producing bacteria with adverse glycemic metabolism in healthy young population. *Scientific Reports*, 7, 1–12.
- Liu, J., & Hekimi, S. (2013). The impact of mitochondrial oxidative stress on bile acid-like molecules in *C. elegans* provides a new perspective on human metabolic diseases. *Worm*, 2, e21457.
- Liu, S., Hu, H., & Li, C. (2016b). Antioxidant activities of novel galloyl phytosterols evaluated by human erythrocytes with the aid of confocal microscopy imaging. *Journal of Functional Foods*, 22, 224–231.
- Llewellyn, S. R., Britton, G. J., Contijoch, E. J., Vennaro, O. H., Mortha, A., Colombel, J. F., Grinspan, A., Clemente, J. C., Merad, M., & Faith, J. J. (2018). Interactions between diet and the intestinal microbiota alter intestinal permeability and colitis severity in mice. *Gastroenterology*, 154, 1037–1046.
- Llopis, S., Rodrigo, M. J., González, N., Genovés, S., Zacarías, L., Ramón, D., & Martorell, P. (2019).  $\beta$ -Cryptoxanthin reduces body fat and increases oxidative stress response in *Caenorhabditis elegans* model. *Nutrients*, 11, 232.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3, 330–338.
- Loo, J. Van, Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T., & van den Heuvel, E. (1999). Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*, 81, 121–132.



- López, J. F., Fuster, V., & Alberich, R. (2016). La utilización de los esteroides vegetales en la práctica clínica: de la química a la clínica. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, 28, 283–294.
- López-García, G., Alegría, A., Barberá, R., & Cilla, A. (2018). Antiproliferative effects and mechanism of action of phytosterols derived from bioactive plant extracts. In Ullah, M. F. & Ahmad, A. (Eds.) *Nutraceuticals and Natural Product Derivatives: Disease, Prevention & Discovery*. (1st ed.) New York: Wiley-Blackwell, 145–165.
- López-Marcos, M. C., Bailina, C., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2015). Effects of various fibre-rich extracts on cholesterol binding capacity during *in vitro* digestion of pork patties. *Food and Function*, 6, 3473–3478.
- Luo, X., Wang, Q., Zheng, B., Lin, L., Chen, B., Zheng, Y., & Xiao, J. (2017). Hydration properties and binding capacities of dietary fibers from bamboo shoot shell and its hypolipidemic effects in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1003–1009.
- Maathuis, A. J. H., van den Heuvel, E. G., Schoterman, M. H. C., & Venema, K. (2012). Galacto-oligosaccharides have prebiotic activity in a dynamic *in vitro* colon model using a <sup>13</sup>C-labeling technique. *The Journal of Nutrition*, 142, 1205–1212.
- Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 305–344.
- Maldonado-Pereira, L., Schweiss, M., Barnaba, C., & Medina-Meza, I. G. (2018). The role of cholesterol oxidation products in food toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 908–939.
- Manzur-Jattin, F., Álvarez-Ortega, N., Moneriz-Pretell, C., Corrales-Santander, H., & Cantillo-García, K. (2016). Eriptosis: mecanismos moleculares y su implicación en la enfermedad aterotrombótica. *Revista Colombiana de Cardiología*, 23, 218–226.
- Martins, C. M., Fonseca, F. A., Ballus, C. A., Figueiredo-Neto, A. M., Meinhart, A. D., de Godoy, H. T., & Izar, M. C. (2013). Common sources and composition of phytosterols and their estimated intake by the population in the city of São Paulo, Brazil. *Nutrition*, 29, 865–871.
- Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Functional Foods in Health and Disease*, 5, 209–223.
- Matsuoka, K., Nakazawa, T., Nakamura, A., Honda, C., Endo, K., & Tsukada, M. (2008). Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterol and stanol in bile salt micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 154, 87–93.
- Mayangsari, Y., & Suzuki, T. (2018). Resveratrol ameliorates intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice and intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 12666–12674.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food and Function*, 1, 32–59.
- Mel'nikov, S. M., Seijen Ten Hoorn, J. W. M., & Eijkelenboom, A. P. A. M. (2004). Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: An *in vitro* study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 127, 121–141.
- Miller, P. E., & Snyder, D. C. (2012). Phytochemicals and cancer risk: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition in Clinical Practice*, 27, 599–612.

- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J. Weitschies, W., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, *5*, 1113–1124.
- Minekus, M., Jelier, M., Xiao, J. Z., Kondo, S., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Bos, M., Dunnewind, B., & Havenaar, R. (2005). Effect of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on the bioaccessibility of fat and cholesterol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *69*, 932–938.
- Misawa, E., Tanaka, M., Nomaguchi, K., Nabeshima, K., Yamada, M., Toida, T., & Iwatsuki, K. (2012). Oral ingestion of Aloe vera phytosterols alters hepatic gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 2799–2806.
- Montserrat-de la Paz, S., Fernández-Arche, M. A., Bermúdez, B., & García-Giménez, M. D. (2015). The sterols isolated from evening primrose oil inhibit human colon adenocarcinoma cell proliferation and induce cell cycle arrest through upregulation of LXR. *Journal of Functional Foods*, *12*, 64–69.
- Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K., & Hicks, K. B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, *70*, 35–61.
- Moreno-Arriola, E., Cárdenas-Rodríguez, N., Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Carmona-Aparicio, L., & Ortega-Cuellar, D. (2014). *Caenorhabditis elegans*: A useful model for studying metabolic disorders in which oxidative stress is a contributing factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*, 705253.
- Nehir El, S., Karakaya, S., Simsek, S., Dupont, D., Menfaatli, E., & Eker, A. T. (2015). *In vitro* digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides. *Food and Function*, *6*, 2322–2330.
- Newburg, D. S., Ko, J. S., Leone, S., & Nanthakumar, N. N. (2016). Human milk oligosaccharides and synthetic galactosyloligosaccharides contain 3′-, 4-, and 6′-galactosyllactose and attenuate inflammation in human T84, NCM-460, and H4 cells and intestinal tissue *ex vivo*. *The Journal of Nutrition*, *146*, 358–367.
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21<sup>st</sup> century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, *390*, 2769–2778.
- Niemoeller, O. M., Föller, M., Lang, C., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Retinoic acid induced suicidal erythrocyte death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *21*, 193–202.
- Nik, A. M., Corredig, M., & Wright, A. J. (2011). Release of lipophilic molecules during *in vitro* digestion of soy protein-stabilized emulsions. *Molecular Nutrition and Food Research*, *55*, 278–289.
- Normén, A. L., Brants, H. A. M., Voorrips, L. E., Andersson, H. A., Van Den Brandt, P. A., & Goldbohm, R. A. (2001). Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands: Cohort study on diet and cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, *74*, 141–148.
- Normén, L., Bryngelsson, S., Johnsson, M., Evheden, P., Ellegård, L., Brants, H., Andersson, H., & Dutta, P. (2002). The phytosterol content of some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*, 693–704.

- Normén, L., Ellegård, L., Brants, H., Dutta, P., & Andersson, H. (2007). A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*, 193–201.
- Nsor-Atindana, J., Zhong, F., & Mothibe, K. J. (2012). *In vitro* hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells. *Food and Function*, *3*, 1044–1050.
- Olkkonen, V. M., Gylling, H., & Ikonen, E. (2017). Plant sterols, cholesterol precursors and oxysterols: Minute concentrations—major physiological effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *169*, 4–9.
- OMS (2018). Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>. Acceso: 31 de octubre de 2019.
- Ortega-González, M., Ocón, B., Romero-Calvo, I., Anzola, A., Guadix, E., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Sánchez de Medina, F., & Martínez-Augustin, O. (2014). Nondigestible oligosaccharides exert nonprebiotic effects on intestinal epithelial cells enhancing the immune response via activation of TLR4-NFκB. *Molecular Nutrition and Food Research*, *58*, 384–393.
- Osman, A. (2015). Synthesis of prebiotic galacto-oligosaccharides: science and technology. In Watson, R. & Preedy, V. (Eds.) *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*. (1st ed.) London: Elsevier Inc., 135–154.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, *76*, 6–15.
- Perdijk, O., Baarlen, P. Van, Fernandez-Gutierrez, M. M., Brink, E. Vanden, Schuren, F. H. J., Brugman, S., Savelkoul, H. F. J., Kleerebezem, M., & Neerven, R. J. J. Van (2019). Sialyllactose and galactooligosaccharides promote epithelial barrier functioning and distinctly modulate microbiota composition and short chain fatty acid production *in vitro*. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1–14.
- Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 718617.
- Piironen, V., Toivo, J., Puupponen-Pimiä, R., & Lampi, A. M. (2003). Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*, 330–337.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., & Triadou, E. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, *47*, 323–330.
- Plat, J., Baumgartner, S., Vanmierlo, T., Lütjohann, D., Calkins, K. L., Burrin, D. G., Guthrie, G., Thijs, C., Te Velde, A. A., ACE, V., Sverdlov, R., Garssen, J., Wouters, K., Trautwein, E. A., Wolfs, T. G., van Gorp, C., Mulder, M. T., Riksen, N. P., Groen, A. K., & Mensink, R. P. (2019). Plant-based sterols and stanols in health & disease: “Consequences of human development in a plant-based environment?” *Progress in Lipid Research*, *74*, 87–102.
- Plat, J., Hendrikx, T., Bieghs, V., Jeurissen, M. L. J., Walenbergh, S. M. A., Van Gorp, P. J., De Smet, E., Konings, M., Vreugdenhil, A. C. E., Guichot, Y. D., Rensen, S. S., Buurman, W. A., Greve, J. W. M., Lütjohann, D., Mensink, R. P., & Shiri-Sverdlov, R. (2014). Protective role of plant sterol and stanol esters in liver inflammation: Insights from mice and humans. *PLoS ONE*, *9*, e110758.
- Qadri, S. M., Hasan, M., Michael, F. A., & Florian, L. (2009). Inhibition of suicidal erythrocyte death by xanthohumol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 7591–7595.

- Qamar, T. R., Syed, F., Nasir, M., Rehman, H., Zahid, M. N., Liu, R. H., & Iqbal, S. (2016). Novel combination of prebiotics galacto-oligosaccharides and inulin-inhibited aberrant crypt foci formation and biomarkers of colon cancer in Wistar rats. *Nutrients*, *8*, 465–479.
- Raicht, R. F., Cohen, B. I., Fazzini, E. P., Sarwal, A. N., & Takahashi, M. (1980). Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Research*, *40*, 403–405.
- Ramprasath, V. R., & Awad, A. B. (2015). Role of phytosterols in cancer prevention and treatment. *Journal of AOAC International*, *98*, 735–738.
- Ras, R. T., Geleijnse, J. M., & Trautwein, E. A. (2014). LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: A meta-analysis of randomised controlled studies. *British Journal of Nutrition*, *112*, 214–219.
- Reglamento 1924/2006/UE. Parlamento Europeo y del consejo de 20 de diciembre relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea L404/9*.
- Reglamento 384/2010/UE. De la comisión de 5 de mayo de 2010 sobre la autorización o denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea L113/6*.
- Reglamento 432/2012/UE. De la comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea L136*.
- Reglamento 686/2014/UE. De la comisión de 20 de junio de 2014 por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 983/2009 y (UE) no 384/2010 en lo que se refiere a las condiciones de uso de determinadas declaraciones de propiedades saludables al efecto de los fitoesteroles y fitoestanoles en la reducción del colesterol LDL en la sangre. *Diario Oficial de la Unión Europea L182/27*.
- Reglamento 983/2009/UE. De la comisión de 21 de octubre de 2009 sobre la autorización o la denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea L277/3*.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *75*, 588–602.
- Richmond, B. L., Boileau, A. C., Zheng, S., Huggins, K. W., Granholm, N. A., Tso, P., & Hui, D. Y. (2001). Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A2-deficient mice. *Gastroenterology*, *120*, 1193–1202.
- Rodrigues, D. B., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2016). An *in vitro* digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: Moving forward towards standardization. *Food and Function*, *7*, 4992–5001.
- Roussi, S., Gossé, F., Aoudé-Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., & Raul, F. (2007). Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7 $\beta$ -hydroxysterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis*, *12*, 87–96.
- Sadek, N. F., Yuliana, N. D., Prangdimurti, E., Priosoeryanto, B. P., & Budijanto, S. (2017). Plant sterol esters in extruded food model inhibits colon carcinogenesis by suppressing inflammation and stimulating apoptosis. *Journal of Medicinal Food*, *20*, 659–666.

- Sahin, K., Orhan, C., Akdemir, F., Tuzcu, M., Sahin, N., Yılmaz, I., & Juturu, V. (2017).  $\beta$ -Cryptoxanthin ameliorates metabolic risk factors by regulating NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways in insulin resistance induced by high-fat diet in rodents. *Food and Chemical Toxicology*, *107*, 270–279.
- Sangwan, V., Tomar, S. K., Singh, R. R. B., Singh, A. K., & Ali, B. (2011). Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *Journal of Food Science*, *76*, 103–111.
- Scholz, B., Guth, S., Engel, K. H., & Steinberg, P. (2015). Phytosterol oxidation products in enriched foods: Occurrence, exposure, and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, *59*, 1339–1352.
- Shahzad, N., Khan, W., Shadab, M. D., Ali, A., Saluja, S. S., Sharma, S., Al-Allaf, F. A., Abduljaleel, Z., Ibrahim, I. A. A., Abdel-Wahab, A. F., Afify, M. A., & Al-Ghamdi, S. S. (2017). Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *88*, 786–794.
- Shanmugam, G., Mohankumar, A., Kalaiselvi, D., Nivitha, S., Muruges, E., Shanmughavel, P., & Sundararaj, P. (2017). Diosgenin a phytosterol substitute for cholesterol, prolongs the lifespan and mitigates glucose toxicity via DAF-16/FOXO and GST-4 in *Caenorhabditis elegans*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *95*, 1693–1703.
- Shen, Z. H., Zhu, C. X., Quan, Y. S., Yang, Z. Y., Wu, S., Luo, W. W., Tan, B., & Wang, X. Y. (2018). Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World Journal of Gastroenterology*, *24*, 5–14.
- Silk, D. B. A., Davis, A., Vulevic, J., Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2009). Clinical trial: The effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *29*, 508–518.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, *5*, 1417–1435.
- Sun, J., Liang, W., Yang, X., Li, Q., & Zhang, G. (2019). Cytoprotective effects of galactooligosaccharides on colon epithelial cells via up-regulating miR-19b. *Life Sciences*, *231*, 116589.
- Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2017). DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 1–8.
- te Velde, A. A., Brüll, F., Heinsbroek, S. E. M., Meijer, S. L., Lütjohann, D., Vreugdenhil, A., & Plat, J. (2015). Effects of dietary plant sterols and stanol esters with low- and high-fat diets in chronic and acute models for experimental colitis. *Nutrients*, *7*, 8518–8531.
- Tejeda-Benitez, L., & Olivero-Verbel, J. (2016). *Caenorhabditis elegans*, a biological model for research in toxicology article in reviews of environmental contamination and toxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *237*, 1–29.
- Ten Bruggencate, S. J. M., Bovee-Oudenhoven, I. M. J., Lettink-Wissink, M. L. G., & Van der Meer, R. (2005). Dietary fructooligosaccharides increase intestinal permeability in rats. *The Journal of Nutrition*, *135*, 837–842.
- Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Cilla, A., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2014). Oxysterol mixture in hypercholesterolemia-relevant proportion causes oxidative stress-dependent eryptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *34*, 1075–1089.
- Testa, G., Rossin, D., Poli, G., Biasi, F., & Leonarduzzi, G. (2018). Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie*, *153*, 220–231.
- Trautwein, E. A., Duchateau, G. S. M. J. E., Lin, Y., Mel'nikov, S. M., Molhuizen, H. O. F., & Ntanios, F. Y. (2003). Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *105*, 171–185.

- Ubeyitogullari, A., & Ciftci, O. N. (2019). *In vitro* bioaccessibility of novel low-crystallinity phytosterol nanoparticles in non-fat and regular-fat foods. *Food Research International*, *123*, 27–35.
- Van De Walle, J., Hendrickx, A., Romier, B., Larondelle, Y., & Schneider, Y. J. (2010). Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicology In Vitro*, *24*, 1441–1449.
- Vanfleteren, J. R. (1993). Oxidative stress and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, *292*, 605–608.
- Vanmierlo, T., Bogie, J. F. J., Mailleux, J., Vanmol, J., Lütjohann, D., Mulder, M., & Hendriks, J. J. A. (2015). Plant sterols: Friend or foe in CNS disorders? *Progress in Lipid Research*, *58*, 26–39.
- Vanmierlo, T., Husche, C., Schött, H. F., Pettersson, H., & Lütjohann, D. (2013). Plant sterol oxidation products-analogs to cholesterol oxidation products from plant origin? *Biochimie*, *95*, 464–472.
- Vejux, A., Abed-Vieillard, D., Hajji, K., Zarrouk, A., Mackrill, J. J., Ghosh, S., Nury, T., Yammine, A., Zaibi, M., Mihoubi, W., Bouchab, H., Nasser, B., Grosjean, Y., & Lizard, G. (2019). 7-Ketocholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol: *In vitro* and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochemical Pharmacology*, *3*, 113648.
- Verheijden, K. A. T., Akbari, P., Willemsen, L. E. M., Kraneveld, A. D., Folkerts, G., Garssen, J., Fink-Gremmels, J., & Braber, S. (2015). Inflammation-induced expression of the alarmin interleukin 33 can be suppressed by galacto-oligosaccharides. *International Archives of Allergy and Immunology*, *167*, 127–136.
- Von Holtz, R. L., Fink, C. S., & Awad, A. B. (1998).  $\beta$ -Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer*, *32*, 8–12.
- Vulevic, J., Drakoularakou, A., Yaqoob, P., Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2008). Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel *trans*-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, *88*, 1438–1446.
- Vulevic, J., Juric, A., Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2013). A mixture of *trans*-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults. *The Journal of Nutrition*, *143*, 324–331.
- Vulevic, J., Juric, A., Walton, G. E., Claus, S. P., Tzortzis, G., Toward, R. E., & Gibson, G. R. (2015). Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons. *British Journal of Nutrition*, *114*, 586–595.
- Wen, X., Hempel, J., Schweiggert, R. M., Wang, Y., Ni, Y., & Carle, R. (2018). Screening of critical factors influencing the efficient hydrolysis of zeaxanthin dipalmitate in an adapted *in vitro*-digestion model. *Food Chemistry*, *257*, 36–43.
- Whisner, C. M., Martin, B. R., Schoterman, M. H. C., Nakatsu, C. H., McCabe, L. D., McCabe, G. P., Wastney, M. E., Van Den Heuvel, E. G. H. M., & Weaver, C. M. (2013). Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: A double-blind cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, *110*, 1292–1303.
- Wu, P., Jia, F., Zhang, B., & Zhang, P. (2017). Risk of cardiovascular disease in inflammatory bowel disease (review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *13*, 395–400.
- Xiong, Y. J., Deng, Z. B., Liu, J. N., Qiu, J. J., Guo, L., Feng, P. P., Sui, J. R., Chen, D. P., & Guo, H. S. (2019). Enhancement of epithelial cell autophagy induced by sinensetin alleviates epithelial barrier dysfunction in colitis. *Pharmacological Research*, *148*, 104461.

Yao, Y., Zhao, G., Xiang, J., Zou, X., Jin, Q., & Wang, X. (2016). Lipid composition and structural characteristics of bovine, caprine and human milk fat globules. *International Dairy Journal*, 56, 64–73.

Zong, Y., Gao, J., Feng, H., Cheng, B., & Zhang, X. (2014). Toxicity of 7-ketocholesterol on lethality, growth, reproduction, and germline apoptosis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 77, 716–723.





*Anexo/Annexe I:*

*Artículos publicados/Published articles*





Autorización para la publicación en la Tesis Doctoral/ *Authorization for publication in the Doctoral Thesis:*

**The impact of galactooligosaccharides on the bioaccessibility of sterols in a plant sterol-enriched beverage: adaptation of the harmonized INFOGEST digestion method**

V. Blanco-Morales, G. López-García, A. Cilla, G. Garcia-Llatas, R. Barberá, M. J. Lagarda, L. M. Sánchez-Siles and A. Alegria, *Food Funct.*, 2018, **9**, 2080  
DOI: 10.1039/C8FO00155C

If you are the author of this article you do not need to formally request permission to reproduce figures, diagrams etc. contained in this article in third party publications or in a thesis or dissertation provided that the correct acknowledgement is given with the reproduced material.

If you are not the author of this article and you wish to reproduce material from it in a third party non-RSC publication you must [formally request permission](#) using Copyright Clearance Center. Go to our [Instructions for using Copyright Clearance Center page](#) for details.

Authors contributing to RSC publications (journal articles, books or book chapters) do not need to formally request permission to reproduce material contained in this article provided that the correct acknowledgement is given with the reproduced material.

Autorización para la publicación en la Tesis Doctoral/ *Authorization for publication in the Doctoral Thesis:*



**Protective effect of antioxidants contained in milk-based fruit beverages against sterol oxidation products**

Author: Gabriel López-García, Antonio Cilla, Reyes Barberá, Amparo Alegría

Publication: Journal of Functional Foods

Publisher: Elsevier

Date: March 2017

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

---

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

Autorización para la publicación en la Tesis Doctoral/ *Authorization for publication in the Doctoral Thesis:*

Anti-Inflammatory and Cytoprotective Effect of Plant Sterol and Galactooligosaccharides-Enriched Beverages in Caco-2 Cells



Author: Gabriel López-García, Antonio Cilla, Reyes Barberá, et al

Publication: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Jul 1, 2019

Copyright © 2019, American Chemical Society


---

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

Autorización para la publicación en la Tesis Doctoral/ *Authorization for publication in the Doctoral Thesis:*



**Effect of plant sterol and galactooligosaccharides enriched beverages on oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans***  
Author: G. López-García, A. Cilla, E. Barberá, S. Genovés, P. Martorell, A. Alegría  
Publication: Journal of Functional Foods  
Publisher: Elsevier  
Date: February 2020  
© 2019 Elsevier Ltd







Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright/author-rights>

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

Autorización para la publicación en la Tesis Doctoral/ *Authorization for publication in the Doctoral Thesis:*

Open Access Article

## Effect of a Milk-Based Fruit Beverage Enriched with Plant Sterols and/or Galactooligosaccharides in a Murine Chronic Colitis Model

by  Gabriel López-García <sup>1</sup>,  Antonio Cilla <sup>1,\*</sup>   Reyes Barberá <sup>1</sup>,  Amparo Alegría <sup>1</sup> and  María C. Recio <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés/n, 46100 Burjassot (Valencia), Spain


<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés/n, 46100 Burjassot (Valencia), Spain

\* Author to whom correspondence should be addressed.

*Foods* **2019**, *8*(4), 114; <https://doi.org/10.3390/foods8040114>

Received: 7 March 2019 / Revised: 29 March 2019 / Accepted: 1 April 2019 / Published: 4 April 2019

(This article belongs to the Special Issue [Development of Food Chemistry, Natural Products, and Nutrition Research](#))

 This is an open access article distributed under the [Creative Commons Attribution License](#) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Autorización para la publicación en la Tesis Doctoral/ *Authorization for publication in the Doctoral Thesis:*



**Antiproliferative effect of plant sterols at colonic concentrations on Caco-2 cells**

Author: Gabriel López-García, Antoniò Cilla, Reyes Barberà, Amparo Alegria

Publication: Journal of Functional Foods

Publisher: Elsevier

Date: December 2017

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

---

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>



Autorización para la publicación en la Tesis Doctoral/ *Authorization for publication in the Doctoral Thesis:*



Effects of Plant Sterols or  $\beta$ -Cryptoxanthin at Physiological Serum Concentrations on Suicidal Erythrocyte Death

Author: Andrea Alvarez-Sala, Gabriel López-García, Alessandro Altanzio, et al

Publication: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Feb 1, 2018

Copyright © 2018, American Chemical Society

---

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

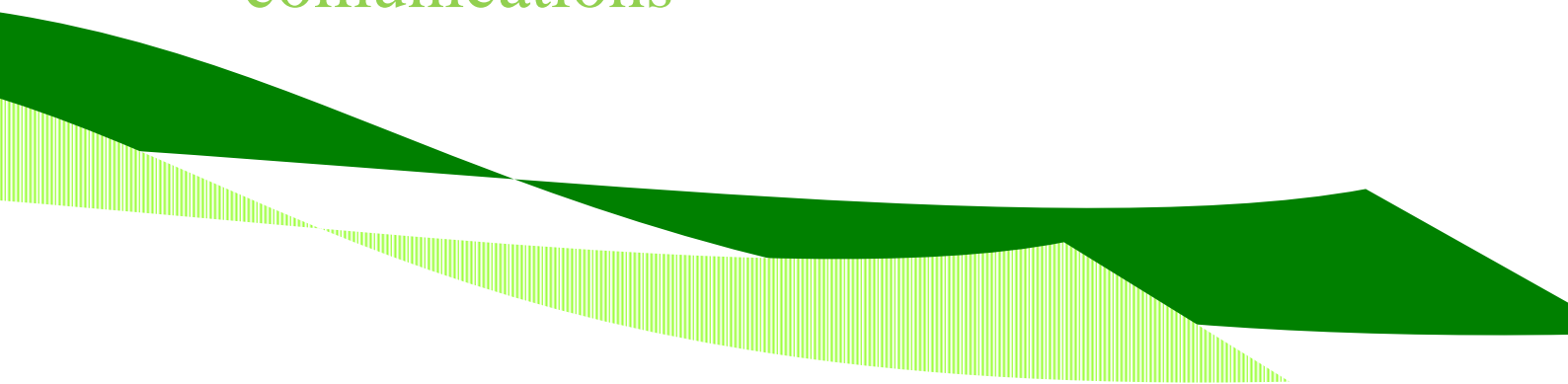
This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.



*Anexo/Annexe II:*

Comunicaciones a congresos/ Congress  
communications





**Autores:** López-García, G., Cilla, A., Barberá, R., Alegría, A.

**Título:** Efecto citoprotector de las fracciones bioaccesibles de dos bebidas funcionales con/sin esteroides vegetales frente al estrés oxidativo inducido por una mezcla de óxidos de esteroides en células Caco-2

**Tipo de participación:** Comunicación oral

**Congreso:** IV Jornadas de Toxicología 2016

**Publicación:** Libro de resúmenes (pág. 5-6)

**Lugar de celebración:** Valencia (España)

**Año:** 2016

---

**Autores:** López-García, G., Cilla, A., Barberá, R., Alegría, A.

**Título:** Antiproliferative effect of plant sterols present in an enriched milk-based fruit beverages at colonic concentrations

**Tipo de participación:** Poster

**Congreso:** 1<sup>st</sup> International Conference on Food Bioactives and Health

**Publicación:** Libro de resúmenes (pág. 197)

**Lugar de celebración:** Norwich (Reino Unido)

**Año:** 2016

---

**Autores:** López-García, G., Blanco-Morales, V., Cilla, A., García-Llatas, G., Barberá, R., Lagarda, M.J., Alegría, A.

**Título:** Bioaccessibility of plant sterols in plant sterol enriched milk-based fruit beverages: comparison of two *in vitro* methods

**Congreso:** 5<sup>th</sup> International Conference on Food Digestion

**Tipo de participación:** Póster

**Lugar de celebración:** Rennes (Francia)

**Año:** 2017

---

**Autores:** Blanco-Morales, V., López-García, G., Cilla, A., Garcia-Llatas, G., Barberá, R., Lagarda, M.J., Alegría, A.

**Título:** Plant sterol enriched milk-based fruit beverages with or without galactooligosaccharides: Plant sterol stability and bioaccessibility

**Congreso:** 31<sup>st</sup> EFFOST International Conference

**Tipo de participación:** Póster

**Lugar de celebración:** Sitges (España)

**Año:** 2017

---

**Autores:** Álvarez-Sala, A., **López-García, G.**, Attanzio, A., Tesoriere, L., Barberá, R., Cilla, A., Alegria, A.

**Título:** Pro- or anti-eryptotic effect of phytosterols and/or  $\beta$ -cryptoxanthin at serum concentrations with/without induced oxidative stress

**Congreso:** 31<sup>st</sup> EFFOST International Conference

**Tipo de participación:** Póster

**Lugar de celebración:** Sitges (España)

**Año:** 2017

---

**Autores:** Blanco-Morales, V., **López-García, G.**, Cilla, A., Garcia-Llatas, G., Barberá, R., Lagarda, M.J., A. Alegría.

**Título:** Métodos *in vitro* para la evaluación de la bioaccesibilidad de esteroides: armonización de métodos. Aplicación a bebidas de zumo de frutas y leche

**Congreso:** IV Congreso de Estudiantes de Nutrición Humana y Dietética

**Tipo de participación:** Póster y Comunicación oral

**Lugar de celebración:** Valencia (España)

**Año:** 2017

---

**Autores:** **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Martorell, P., Genovés, S., Alegría, A.

**Título:** *Caenorhabditis elegans* as oxidative stress model induced by cholesterol oxidation products: optimization parameters

**Congreso:** 4<sup>th</sup> International student congress of food science and technology

**Tipo de participación:** Comunicación oral

**Publicación:** Libro resúmenes (pág. 28)

**Lugar de celebración:** Valencia (España)

**Año:** 2018

---

**Autores:** **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Alegría, A.

**Título:** Preventive effect of plant sterol enriched milk-based fruit beverages against oxidative stress in Caco-2 cells

**Congreso:** 2<sup>nd</sup> International Conference on Food Bioactives and Health

**Tipo de participación:** Póster

**Publicación:** Libros de resúmenes (pág. 300)

**Lugar de celebración:** Lisboa (Portugal)

**Año:** 2018

---

**Autores:** **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Martorell, P., Genovés, S., Alegría, A.

**Título:** Antioxidant and anti-inflammatory effects of plant sterol enriched milk-based fruit beverages in *Caenorhabditis elegans*

**Congreso:** 2<sup>nd</sup> International Conference on Food Bioactives and Health

**Tipo de participación:** Póster

**Publicación:** Libros de resúmenes (pág. 301)

**Lugar de celebración:** Lisboa (Portugal)

**Año:** 2018

---

**Autores:** Recio, M.C., **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Alegría, A.

**Título:** Effect of milk-based fruit beverage enriched with plant sterols and galacto-oligosaccharides in a murine colitis model induced by dextran

**Congreso:** 1<sup>st</sup> Meeting in Translational Pharmacology

**Tipo de participación:** Póster

**Lugar de celebración:** Santiago de Compostela (España)

**Año:** 2018

---

**Autores:** **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R., Martorell, P., Genovés, S., Alegría, A.

**Título:** Beneficial effects of plant sterol enriched milk-based fruit beverages upon oxidative stress and longevity in *C. elegans*

**Congreso:** 6<sup>th</sup> International student congress of food science and technology

**Tipo de participación:** Póster

**Publicación:** Libros de resúmenes (pág. 42)

**Lugar de celebración:** Valencia (España)

**Año:** 2019

---

**Autores:** Alegría, A., **López-García, G.**, Cilla, A., Barberá, R.

**Título:** Impact of bioaccessible fractions from plant sterol enriched milk-based fruit beverages on pro-inflammatory mediators in intestinal cells

**Congreso:** 6<sup>th</sup> International Conference on Food Digestion

**Tipo de participación:** Póster

**Publicación:** Libro de resúmenes (pág. 176)

**Lugar de celebración:** Granada (España)

**Año:** 2019

---