



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría

**EFFECTO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA  
SOBRE EL DESARROLLO COGNITIVO DE LA  
DESCENDENCIA**

**“Effect of human milk oligosaccharides on cognitive  
development of the offspring”**

**Elena Oliveros Delgado**

Programa de Doctorado en Biomedicina

Línea de Investigación: Neurociencias Básicas

Granada, a 28 de Octubre de 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Elena Oliveros Delgado  
ISBN: 978-84-1117-322-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/74722>



Memoria de Tesis Doctoral presentada por

**Elena Oliveros Delgado**

para obtener el Grado de Doctor en Farmacia

por la Universidad De Granada

Esta tesis doctoral ha estado dirigida por:

**Prof. Cristina Campoy Folgoso**

Departamento de Pediatría

Facultad de Medicina

Universidad de Granada

**Dra. M<sup>a</sup> Jesús Martín Martín**

Dra. en Biología

Abbott Laboratories S.A.



## FINANCIACION

Este trabajo ha sido financiado por Abbott Laboratories S.A. y por el Centro de Excelencia EURISTIKOS del Departamento de Pediatría de la Universidad de Granada.

El estudio PREOBE ha sido financiado por el Proyecto de Excelencia con referencia nº P06-CTS-02341 de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia/Junta de Andalucía.

El estudio PREOBE está registrado en [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov), identificador (NCT01634464).





## **AGRADECIMIENTOS**

Ha llegado el final de este proyecto que comencé hace algunos años con el propósito de continuar formándome en el ámbito científico y de la investigación. Sin embargo, de todo este largo proceso, me llevo, no sólo el conocimiento adquirido, sino también experiencias personales que me han enriquecido y me han permitido conocerme mejor a mí misma y saber cómo hacer frente a los obstáculos que siempre aparecen en el camino.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, María Jesús (Chus) Martín y Cristina Campoy, por aceptar guiarme y orientarme en este trabajo de investigación; de ellas he aprendido a desarrollar un pensamiento científico y me han enseñado que trabajando con ganas y esfuerzo todo se puede conseguir.

A todos y cada uno de mis compañeros del departamento de Investigación de Abbott Laboratorios. A Pilar, Ángela, María, Enrique, Alejandro, Manolo, Javi, Maria Luisa, Lola, Jose M<sup>a</sup> y Cristina, porque desde que llegué el primer día, hace ya casi 14 años, me han brindado toda su ayuda y porque muchos de ellos han hecho posible que este trabajo haya salido adelante. Gracias a todos por esos buenos momentos de risas, que sin duda alguna endulzan los momentos más arduos del día a día. A mis jefes, María Ramírez y Ricardo Rueda, por todo su apoyo y confianza a lo largo de todos estos años, siendo para mí todo un ejemplo a seguir en este, a veces, complicado mundo de la investigación. A los compañeros que han trabajado en el estudio clínico PREOBE por el gran esfuerzo realizado.

A mi familia y amigos que para mí representan un pilar esencial en mi vida. A mis padres que me han dado todo su amor y me brindaron la oportunidad de dedicarme a lo que quisiera siendo siempre un apoyo fundamental. En especial quiero agradecer a mi **padre** que, desde ahí arriba, me sigue ayudando constantemente, no pasa un sólo día sin que te eche de menos. A mis hermanos, Ángela, Inés y Pedro Luis, con los que puedo contar para absolutamente todo y siempre están ahí de manera incondicional. A mis sobris, Ángela, Ana, Maria y Pablo por vuestra alegría que hace que me dé cuenta de lo que de verdad importa en esta vida. A Simón, que en estos últimos meses me ha ayudado tanto y le he privado de tantos fines de semana, sin ti la vida no sería igual. A esa personita que está dentro de mí y que me ha dado tantísimas fuerzas durante este último período, estoy deseando verte la carita.

**Muchísimas gracias a todos.**





# ÍNDICE

1.	ARTICULOS ASOCIADOS A LA TESIS DOCTORAL .....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	5
2.1	Composición de la leche humana. ....	7
2.2	Diversidad de los Oligosacáridos de leche humana (HMOs). ....	11
2.2.1	<i>Estructura de los HMOs.</i> .....	11
2.2.2	<i>Determinación genética del perfil de HMOs.</i> .....	14
2.2.3	<i>Variabilidad entre especies de mamíferos en el perfil de oligosacáridos de la leche.</i> .....	17
2.3	Historia sobre la investigación de los HMOs.....	20
2.4	Metabolismo de los HMOs.....	21
2.5	Funciones biológicas de los HMOs en los recién nacidos. ....	22
2.5.1	<i>Prebióticos.</i> .....	23
2.5.2	<i>Agentes anti-adhesivos.</i> .....	24
2.5.3	<i>Agentes antimicrobianos.</i> .....	27
2.5.4	<i>Moduladores de las células epiteliales intestinales</i> .....	28
2.5.5	<i>Inmunomoduladores.</i> .....	30
2.5.6	<i>Protección frente al desarrollo de alergias.</i> .....	32
2.5.7	<i>Protección frente a Enterocolitis necrotizante.</i> .....	32
2.5.8	<i>Desarrollo cerebral.</i> .....	33
2.6	Estudios clínicos con HMOs. ....	37
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	41
4.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	45
4.1	Experimento 1.....	48
4.1.1	Animales de experimentación. ....	48
4.1.2	<i>Diseño experimental.</i> .....	48
4.1.3	<i>LTP “In vivo”.</i> .....	50
4.1.4	<i>Pruebas de comportamiento.</i> .....	50
4.1.5	<i>Análisis estadístico.</i> .....	53
4.2	Experimento 2.....	54
4.2.1	Animales de experimentación. ....	54
4.2.2	<i>Diseño experimental.</i> .....	54
4.2.3	<i>Cálculo de la dosis de ácido siálico.</i> .....	56
4.2.4	<i>Determinación del contenido de ácido siálico en cerebro.</i> .....	57
4.2.5	<i>Western Blot.</i> .....	58

4.2.6	<i>LTP “In vivo”</i> .....	59
4.2.7	<i>Pruebas de comportamiento</i> .....	59
4.2.8	<i>Análisis estadístico</i> .....	61
4.3	Estudio clínico materno-infantil.....	61
4.3.1	<i>Diseño del estudio</i> .....	61
4.3.2	<i>Análisis de HMOs en leche humana</i> .....	63
4.3.3	<i>Análisis estadístico</i> .....	64
5.	RESULTADOS.....	67
5.1	Experimento 1.....	69
5.1.1	<i>LTP “In vivo”</i> .....	69
5.1.2	<i>Pruebas de comportamiento</i> .....	70
5.2	Experimento 2.....	74
5.2.1	<i>Contenido de ácido siálico en el cerebro</i> .....	74
5.2.2	<i>Western Blot</i> .....	74
5.2.3	<i>LTP “In vivo”</i> .....	75
5.2.4	<i>Pruebas de comportamiento</i> .....	76
5.3	Estudio clínico materno-infantil.....	79
5.3.1	<i>Datos demográficos, de base o referencia</i> .....	79
5.3.2	<i>Concentraciones de HMOs en la leche materna</i> .....	81
5.3.3	<i>Evaluación del neurodesarrollo hasta los 18 meses</i> .....	84
6.	DISCUSIÓN.....	89
6.1	Experimento 1.....	91
6.2	Experimento 2.....	95
6.3	Estudio clínico materno-infantil.....	101
6.4	Discusión general.....	105
7.	CONCLUSIONES.....	109
8.	RESUMEN.....	113
9.	SUMMARY.....	121
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	129
11.	ABREVIATURAS.....	153
12.	ANEXOS.....	157

*1. ARTICULOS ASOCIADOS A LA TESIS*  
*DOCTORAL*



ARTICULOS ASOCIADOS A LA TESIS DOCTORAL

Parte de los resultados presentados en este trabajo se encuentran ya publicados en dos artículos científicos originales; el resto de los resultados forman parte de un artículo en borrador en proceso de publicación.

---

**ARTICULO 1.**

*Oliveros, E.; Ramirez, M.; Vazquez, E.; Barranco, A.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Buck, R.; Rueda, R.; Martin, M.J. Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats. J Nutr Biochem 2016, 31, 20-27; doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.014.*



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

**ScienceDirect**

Journal of Nutritional Biochemistry 31 (2016) 20–27

**Journal of  
Nutritional  
Biochemistry**

Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats<sup>☆</sup>

Elena Oliveros<sup>a,\*</sup>, María Ramirez<sup>a</sup>, Enrique Vazquez<sup>a</sup>, Alejandro Barranco<sup>a</sup>, Agnes Gruart<sup>c</sup>,  
Jose Maria Delgado-Garcia<sup>c</sup>, Rachael Buck<sup>b</sup>, Ricardo Rueda<sup>a</sup>, Maria J. Martin<sup>a</sup>

Índices de calidad de la revista *Journal of Nutritional Biochemistry* del año 2015 obtenidos del Journal Citation Report (JCR Index): Factor de impacto: 4.668; Factor de impacto-5 años: 4.508; Citas totales: 7814. Q1 en la categoría de Nutrición y Dietética (Posición 9/80); Q1 en la categoría de Bioquímica y Biología Molecular (Posición 59/289).

---


**ARTICULO 2.**

**Oliveros, E.; Vazquez, E.; Barranco, A.; Ramirez, M.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Buck, R.; Rueda, R.; Martin, M.J.** *Sialic Acid and Sialylated Oligosaccharide Supplementation during Lactation Improves Learning and Memory in Rats. Nutrients 2018, 10(10), 1519; doi:10.3390/nu10101519.*



Article

**Sialic Acid and Sialylated Oligosaccharide Supplementation during Lactation Improves Learning and Memory in Rats**

Elena Oliveros <sup>1,2,\*</sup>, Enrique Vázquez <sup>1</sup>, Alejandro Barranco <sup>1</sup>, María Ramirez <sup>1</sup>, Agnes Gruart <sup>3</sup>, Jose María Delgado-García <sup>3</sup> , Rachael Buck <sup>4</sup>, Ricardo Rueda <sup>1</sup> and María J. Martín <sup>1</sup>

Índices de calidad de la revista *Nutrients* del año 2017 obtenidos del Journal Citation Report (JCR Index): Factor de impacto: 4.196; Factor de impacto-5 años: 4.603; Citas totales: 12031. Q1 en la categoría de Nutrición y Dietética (Posición 18/83).

---

**ARTICULO EN PROCESO DE PULICACIÓN**

**Oliveros, E.; Martin, M.J.; Torres-Espínola, F.J.; Segura-Moreno, M.T.; Ramírez, M.; Santos-Fandila, A.; Buck, R.; Rueda, R.; Escudero, M.; Catena, A.; Azaryah, H.; Campoy, C.** *Human milk levels of 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose are not impacted by maternal BMI or diabetic status and are positively associated with infant neurodevelopment.*

---

**OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TEMA DE LA TESIS DOCTORAL**

---

**CAPITULO LIBRO**

Martin, M.J.; **Oliveros, E.**; *Sialic Acids in Early Life and Their Impact Beyond Infancy. In Advances in Medicine and Biology. Berhardt, L.V.; Nova Science Publisher, Inc.: NY, USA, 2017; Volume 109; 9781536102079.*

---

## *2. INTRODUCCIÓN*





### 2.1 Composición de la leche humana.

La leche materna es la mejor fuente de alimentación que puede recibir un recién nacido, tanto a término como pretérmino y por ello se considera el “Patrón de Oro” de la alimentación infantil.

La leche humana es una matriz compleja caracterizada por contener una gran cantidad de nutrientes entre los que se distinguen macronutrientes y micronutrientes (Figura 1), muchos de ellos compuestos bioactivos responsables en gran medida de sus efectos beneficiosos como la lactoferrina, la  $\alpha$ -lactoalbúmina o las proteínas de membrana del glóbulo de grasa [1] y otro tipo de compuestos como citoquinas, inmunoglobulinas, hormonas, péptidos, factores de crecimiento, oligosacáridos y nucleótidos [2]. Entre los efectos positivos sobre el estado de salud del individuo asociados al consumo de leche materna en las primeras etapas de la vida están la disminución en el desarrollo de infecciones gastrointestinales, diarreas [3], alergias alimentarias [4], enfermedades autoinmunes como la dermatitis atópica, el asma, la enfermedad celíaca, la enfermedad inflamatoria intestinal o de la diabetes tipo 1 [5], así como del síndrome metabólico y la leucemia.

El período de tiempo durante el cual se prolongue la lactancia materna influirá directamente sobre dichos efectos beneficiosos. De acuerdo con las recomendaciones actuales establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la lactancia materna debe mantenerse como forma exclusiva de alimentación durante los primeros 6 meses de vida, complementándose posteriormente con otros alimentos hasta los dos años.

La composición de la leche materna está determinada genéticamente pero también puede estar influenciada por otros factores como un parto prematuro [6], la hora del día [7] y otras variables maternas como la edad, peso, número de hijos, hábito de fumar, peso [8] o dieta [9].

El agua representa aproximadamente el 87% de la composición total de la leche materna. Tras el agua, los componentes mayoritarios son lactosa (7%), lípidos (3.8%) y proteínas (1%) [10]. La cantidad de energía aportada por la leche materna varía de 65 a 70kcal/100mL y está directamente relacionada con la cantidad de grasa total [7]. Por otra parte, la leche materna se

## INTRODUCCIÓN

caracteriza por ser un fluido dinámico puesto que su perfil de nutrientes va cambiando a lo largo del período de lactancia dependiendo de las necesidades del bebé en cada etapa posnatal.

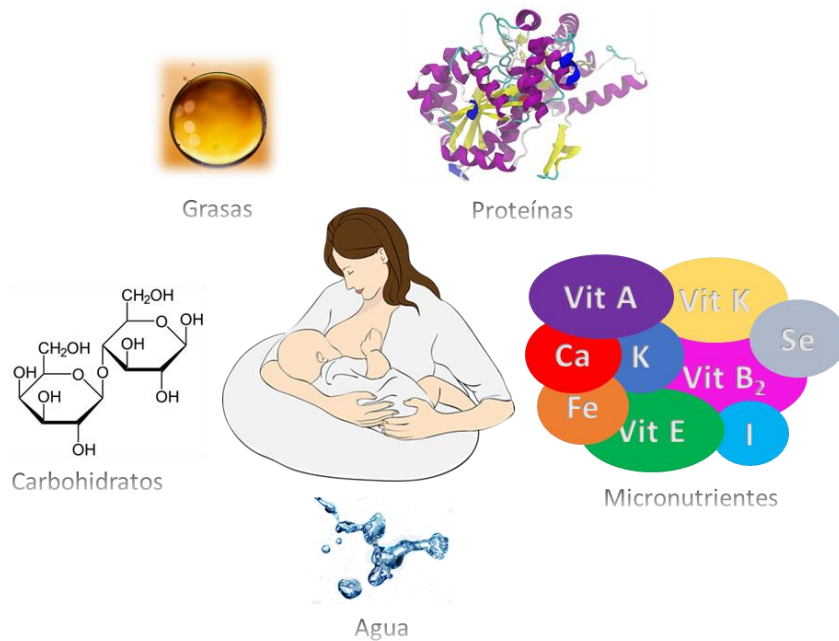


Figura 1. Composición en macronutrientes y micronutrientes de la leche materna.

La concentración promedio de lípidos en la leche materna es de 35 g/L. El contenido lipídico de la leche materna fluctúa en función del periodo posnatal, siendo baja en el calostro, lo cual se traduce en un menor contenido de energético del mismo. Los triglicéridos representan aproximadamente el 98% de esta fracción lipídica que también contiene fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos libres [11]. Los ácidos grasos saturados son los mayoritarios en la leche materna; de hecho la leche materna se caracteriza por su alto contenido en ácido palmítico y ácido oleico que se sitúan en la posición 2 y posiciones 1 y 3 de los triglicéridos, respectivamente [7]. Sin embargo la leche humana también contiene ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFAs por sus siglas en inglés: *Long chain poly-unsaturated fatty acids*) [12,13] siendo su contenido uno de los más variables en función de la dieta materna [7].

En relación con la proteína, su contenido disminuye rápidamente a lo largo del período de lactancia variando de los 14–16 g/L en el calostro a 8–10 g/L en leche madura y sobre 7–8 g/L a partir de los 6 meses [14-16]. Dentro de las proteínas de la leche humana encontramos dos

## INTRODUCCIÓN

fracciones, las proteínas del suero y la caseína. Las proteínas más abundantes son la caseína,  $\alpha$ -lactoalbúmina, lactoferrina, inmunoglobulina A (IgA) y lisozima. Hay otros compuestos nitrogenados no proteicos como la urea, el ácido úrico, creatinina, creatina, aminoácidos y nucleótidos que representan aproximadamente el 25% del nitrógeno en la leche materna [7]. El descenso en el contenido proteico a lo largo de la lactación se debe principalmente a una disminución en la concentración de las proteínas de suero de forma que la proporción de proteína de suero/caseínas varía de 90/10 en la lactación temprana, 60/40 en leche madura y 50/50 en la lactancia más tardía [16]. La cantidad de proteínas en la leche de madres de bebés pretérmino es mayor que la de las madres de bebés a término [6]

El contenido total de carbohidratos es de 75 g/L, siendo el disacárido lactosa el componente mayoritario de la leche materna y que representa un 85% del total de carbohidratos. Los niveles de lactosa son más bajos en calostro y en leche madura comparados con la leche de transición [17] y se ha observado que la leche de aquellas madres que producen mayores volúmenes contienen también una mayor cantidad de lactosa [7]. Además de la lactosa, la leche materna también contiene oligosacáridos complejos comúnmente conocidos como oligosacáridos de leche humana (HMOs por sus siglas en inglés: *Human milk oligosaccharides*). Por el uso extendido entre la comunidad científica, se utilizará el término HMO a lo largo de esta tesis doctoral para hacer referencia a los oligosacáridos de leche humana) [18] que son descritos con mayor detalle en la siguiente sección.

En relación con los micronutrientes, su contenido en la leche materna está altamente relacionado con la dieta y reservas de la madre. Normalmente la leche materna suele cubrir las cantidades necesarias para el adecuado desarrollo del bebé; sin embargo, existen ciertos componentes, como es el caso de las vitaminas K y D que suelen ser deficientes en la leche materna por ello a veces se recomienda una suplementación de dichos compuestos en el recién nacido [7,10].

La leche humana es rica en compuestos biológicamente activos los cuales se definen como elementos capaces de afectar a procesos biológicos y sustratos teniendo un impacto en las funciones y condiciones corporales y, por tanto, en la salud. Algunos de estos compuestos son células, como los macrófagos, inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM), citoquinas (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10,

## INTRODUCCIÓN

TNF $\alpha$ ), quimioquinas (G-CSF, MIF), factores de crecimiento (EGF, eritropoyetina), hormonas (somatostatina, calcitonina), gangliósidos y otros compuestos glicosilados como las mucinas [10].

Como se ha comentado anteriormente, la composición de la leche materna depende de diversos factores entre los que se encuentran ciertas variables maternas como el peso.

Existen evidencias de que el contenido total de proteínas y carbohidratos de la leche humana no se ven afectados por el peso, siendo semejantes en las mujeres con sobrepeso/obesidad y en las mujeres con un peso normal [19,20].

Sin embargo, hay inconsistencias con respecto al contenido de grasa. En algunos estudios se ha observado que la densidad calórica y la grasa total son iguales en la leche de mujeres con sobrepeso/obesidad que en la leche de mujeres de peso normal [19-21], mientras que en otros estudios se han detectado diferencias significativas en este aspecto, con valores más altos en la leche de las mujeres con sobrepeso/obesidad [22,23]. Por otra parte, en relación a la grasa, existen también trabajos que resaltan las diferencias en el perfil de ácidos grasos de la leche materna de las madres con sobrepeso frente al de las madres de peso normal: las madres con sobrepeso/obesidad mostraron un menor contenido de n-3 LCPUFAs, un mayor contenido de n-6 LCPUFAs [21,24-26], niveles más bajos de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs por sus siglas en inglés: *Mono-unsaturated fatty acids*,) [19], mayores cantidades de ácidos grasos saturados ((SFAs por sus siglas en inglés: *Saturated fatty acids*) y PUFAs más bajos [19,26] que las madres de peso normal. También se ha observado que otras moléculas como insulina, leptina [20,27,28], factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  por sus siglas en inglés: *Tumor necrosis factor- $\alpha$* ), IL-6 [29,30] y glucosa [23,29,30] son más altas en la leche de mujeres con sobrepeso/obesidad que en la de mujeres con peso normal probablemente por el consumo de una dieta menos saludable con mayor proporción de ácidos grasos saturados. La microbiota de la leche materna también está condicionado por el peso materno; se ha observado un perfil diferente de especies microbianas y una menor diversidad en la leche materna de mujeres obesas en comparación con la leche humana de madres de peso normal [31-33]. Otras variables maternas, como el estado diabético, se han relacionado también con diferentes perfiles de grasa de la leche humana en comparación

## INTRODUCCIÓN

con un grupo de referencia, lo que podría estar asociado a cambios en el metabolismo de los lípidos [34].

Con respecto a los carbohidratos, distintos estudios parecen indicar que el contenido total es el mismo independientemente del peso materno [19,20]. Sin embargo, existen pocos estudios que hayan evaluado el efecto del sobrepeso/obesidad materna o el estado diabético en la composición de los HMOs de la leche materna. Smilowitz et al. llevaron a cabo un estudio en el que se analizaron las leches de madres con y sin diabetes mellitus gestacional (DMG) para determinar la abundancia de los HMOs, además de otras variables. En los resultados no se encontraron diferencias en la composición de HMOs entre los 2 grupos [35]. Por su parte, Isganaitis y sus coautores sí observaron un efecto de la obesidad en el contenido y composición de los HMOs en muestras de leche de 1 mes postparto [22]. En un estudio más reciente en el que se analizaron 78 muestras de leche humana madura, se observó que la concentración de un HMO, en concreto la 2'-fucosillactosa (2'-FL) estaba correlacionada con el índice de masa corporal pregestacional (pIMC) en madres secretoras [36]. Sin embargo, aún se necesitan más estudios que aclaren el efecto de estas variables maternas en la composición en HMOs.

Como se ha visto anteriormente, la riqueza composicional de la leche humana explica por qué es utilizada como estándar para la elaboración de las leches de fórmula infantiles ya que ha demostrado cubrir con éxito los requerimientos energéticos y nutricionales necesarios para un adecuado desarrollo y crecimiento del recién nacido.

## 2.2 Diversidad de los Oligosacáridos de leche humana (HMOs).

### 2.2.1 Estructura de los HMOs.

Como se comentó anteriormente, la lactosa representa el 85% de la fracción de carbohidratos en la leche materna siendo además el sólido mayoritario. El 15% restante lo constituyen los HMOs. El contenido total de HMOs en la leche materna viene determinado genéticamente y puede variar entre madres en función de otros factores como el período de lactación [37]. Así, la

## INTRODUCCIÓN

concentración de HMOs en el calostro es de unos 20-25 g/L y se va reduciendo a medida que avanza la producción de leche hasta unos 5-15 g/L [38,39]. También se ha observado que la leche de madres con neonatos prematuros tiene concentraciones más altas de oligosacáridos que la de los bebés nacidos a término [40].

La leche humana contiene oligosacáridos en una mayor cantidad y con estructuras más complejas que las encontradas en la leche de otros mamíferos [41]. Sin embargo, aunque la complejidad estructural de HMOs encontrada en leche humana es única, algunas de estas estructuras se encuentran también en la leche de otras especies mamíferas [40]. Dicha diversidad estructural podría ser la responsable de las implicaciones funcionales de los HMOs.

Los HMOs están compuestos básicamente por cinco monosacáridos diferentes: glucosa (Glc), galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) y el ácido siálico N-Acetilneuramínico (Neu5Ac). Estos monosacáridos se conjugan entre sí a través de enlaces glucosídicos. La biosíntesis de HMOs en la glándula mamaria comienza con la formación de un núcleo de lactosa (Gal $\beta$ 1-4Glc) que resulta de la formación de un enlace glucosídico  $\beta$ 1-4 entre una molécula de galactosa (Uridin difosfato-galactosa, UDP-Gal) y otra de glucosa.

Este paso está catalizado por la  $\beta$ 1-4-galactosiltransferasa (Gal-T) en presencia de  $\alpha$ -lactoalbúmina; este complejo compuesto de Gal-T y  $\alpha$ -lactoalbúmina es denominado "lactosa sintasa" o "lactosa sintetasa" (Figura 2).

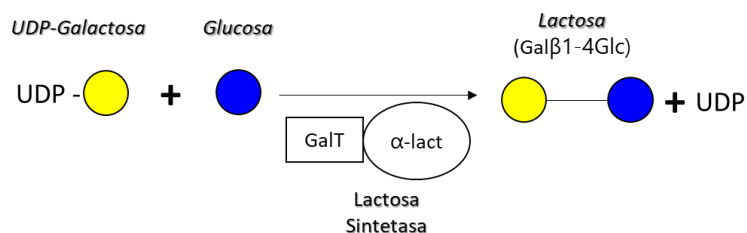


Figura 2. Biosíntesis de la lactosa, estructura central de los HMOs. Modificado de [42].

El cuerpo central de lactosa puede alargarse secuencialmente mediante la adición de unidades de lacto-*N*-biosa (cadena tipo I) o *N*-acetilactosamina (cadena tipo II) mediante enlaces  $\beta$ 1-3 o

## INTRODUCCIÓN

$\beta$ 1-6. El alargamiento con lacto-*N-biosa* termina la cadena, mientras que la *N-acetilactosamina* puede extenderse aún más por la adición de uno de estos dos disacáridos. Estas estructuras centrales pueden ser lineales o ramificadas de forma que un enlace  $\beta$ 1-6 entre dos disacáridos introduce una ramificación en la cadena mientras que una unión  $\beta$ 1-3 da lugar a una estructura lineal (Figura 3). Las estructuras ramificadas se designan como *iso*-HMO mientras que las estructuras lineales se denominan *para*-HMO [43].

El núcleo central de lactosa o los oligosacáridos derivados de su elongación pueden adicionarse de residuos de fucosa, unida mediante enlaces  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3 ó  $\alpha$ 1-4, o ácido siálico con enlaces  $\alpha$ 2-3 ó  $\alpha$ 2-6. De esta forma pueden derivarse varios trisacáridos al añadir una molécula de fucosa o de ácido siálico al núcleo de la lactosa, mediante reacciones catalizadas por diversas enzimas fucosil-transferasas o sialil-transferasas, respectivamente; algunos de los compuestos resultantes son, por ejemplo, 2'-fucosillactosa (2'-FL) y 3'-fucosillactosa (3'-FL), la 3'-sialilactosa (3'-SL) y 6'-sialilactosa (6'-SL) (Figura 3). Otras estructuras más complejas se derivan de pasos de elongación combinados con la adición de más residuos de fucosa o ácido siálico, existiendo también diferentes isómeros [43]. De esta forma en la actualidad se han llegado a identificar más de 200 estructuras diferentes de HMOs [44].

Desde un punto de vista estructural, dentro de los HMOs podemos distinguir tres grupos [36,44,45]:

- a) *HMOs neutros fucosilados*: contienen fucosa en el extremo terminal (p.ej. 2'-FL o lactodifucopentanosas); representan el 35-50% del total de HMOs.
- b) *HMOs neutros no fucosilados*: contienen GlcNAc en la posición terminal (p.ej. lacto-N-tetraosa); representan el 42-55% del total de HMOs.
- c) *HMOs ácidos*: contienen una o más moléculas de Neu5Ac; representan el 12-14% del total de HMOs.



## INTRODUCCIÓN

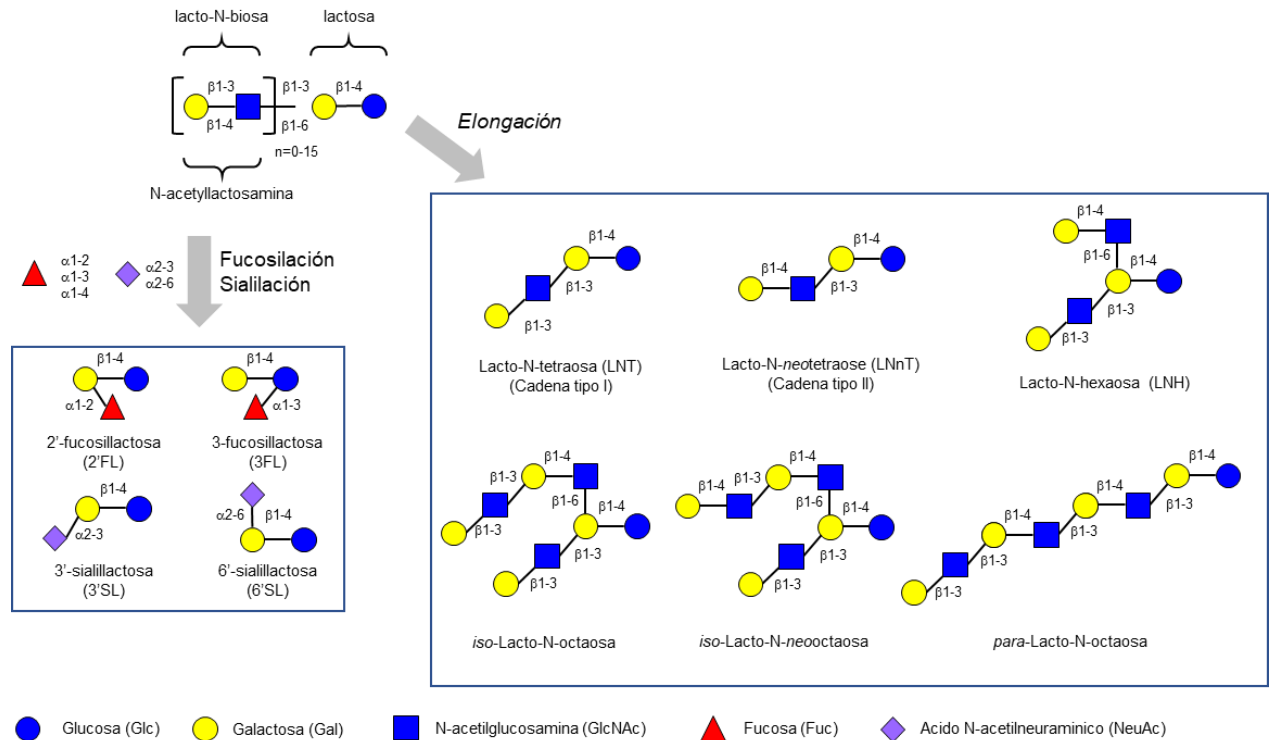


Figura 1. Formación de diversas estructuras de HMOs a partir de pasos de elongación, sialilación o fucosilación. Muchas otras estructuras pueden derivarse de la combinación de estos pasos. Modificado de [40]

### 2.2.2 Determinación genética del perfil de HMOs.

Aunque existen ciertos factores que podrían influir en el perfil de HMOs, como si la gestación es a término o pretérmino, etapa de lactación, número de partos o el entorno ambiental, se ha comprobado que la genética materna tiene un papel determinante en el contenido de HMOs.

Dicho perfil se ha relacionado con factores como el sistema histo-compatible sanguíneo, específicamente el Secretor y el de Lewis: los genes Secretor (*Se*) y de Lewis (*Le*) codifican diferentes fucosil-transferasas [46], concretamente la  $\alpha$ 1-2-fucosyltransferasa (FUT2) y la  $\alpha$ 1-3/4-fucosiltransferasa (FUT3), respectivamente.

Los oligosacáridos resultantes de la acción de dichas enzimas contendrán, por tanto, determinantes antigénicos de los sistemas sanguíneos de Lewis y/o Secretor. Los antígenos del sistema de Lewis ( $Le^a$  y  $Le^b$ ) normalmente se encuentran formando parte de los

## INTRODUCCIÓN

glicoesfingolípidos y glicoproteínas de los eritrocitos, y el resto de los tejidos y fluidos como la saliva o el plasma. Sin embargo, en el caso de la leche materna, dichos antígenos forman parte de oligosacáridos libres, no ligados ni a proteínas ni a lípidos [47].

La FUT2 transfiere fucosa a la galactosa terminal a través de un enlace glucosídico  $\alpha$  1-2; algunos HMOs resultantes de la actividad de FUT2 son, por ejemplo, 2'-FL y LNFP I. En las mujeres secretoras con una FUT2 funcional, la 2'-FL es el principal oligosacárido de la leche, seguido de lacto-N-fucopentaosa I (LNFP I) y di-fucosilactosa (DFL). Estos tres HMOs dependen de la expresión de la FUT2 y son buenos indicadores para evaluar el estado secretor de la madre [48]. Por el contrario, las madres no secretoras carecen de una FUT2 funcional por lo que sus leches que producen no contendrán compuestos  $\alpha$  1-2 fucosilados [43]. Por su parte, la FUT3 cataliza la adición de fucosa principalmente mediante un enlace  $\alpha$ 1-4 a la GlcNAc subterminal, aunque también mediante enlaces  $\alpha$ 1-3. Las estructuras relacionadas con FUT3 son, por ejemplo, LNFP II y LNFP III.

En función de la expresión de los genes *Se* y *Le* y, por tanto, de la presencia de enzimas funcionales FUT2 y FUT3 respectivamente, se distinguen 4 grupos distintos de leche materna [42-44,49,50] (Figura 4):

1. *Grupo 1*: Secretor Le-positivo (*Se+Le+*), puede contener todos los HMOs. Presentan antígenos  $Le^b$ .
2. *Grupo 2*: No Secretor Le-positivos (*Se-Le+*), puede contener 3'-FL, LNFP-II, LNFP-III. Presentan antígenos  $Le^a$ .
3. *Grupo 3*: Secretor Le-negativo (*Se+Le-*), pueden contener 2'-FL, 3'-FL, LNFP-I, LNFP-III. No presentan antígenos  $Le^a$  ni  $Le^b$ .
4. *Grupo 4*: No secretor Le-negativo (*Se -Le-*), puede contener 3'-FL, LNFP-III, LNFP-V. No presentan antígenos  $Le^a$  ni  $Le^b$ .

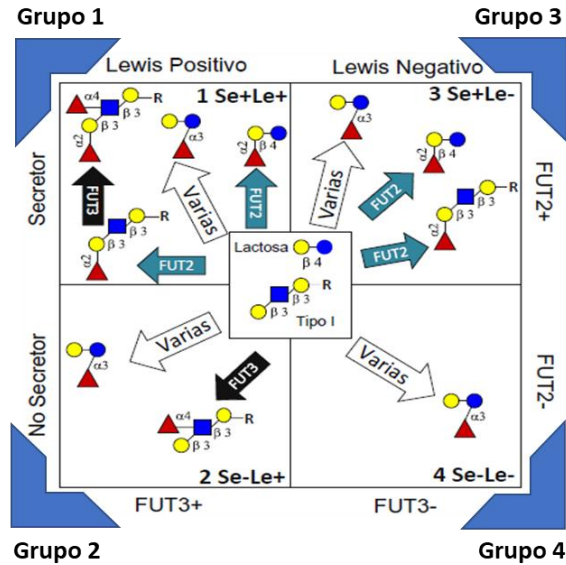


Figura 2. Grupos de leche humana en función del patrón de expresión de los genes *Se* y *Le*. Modificado de [42].

Sin embargo, existen algunas excepciones que indican que dicha división de la leche materna en cuatro grupos podría estar simplificando en exceso la complejidad estructural de los HMOs. Por ejemplo, se ha observado que la leche de mujeres que no expresan ni la FUT2 ni la FUT3 (Se-Le) contienen HMO fucosilados como 3'-FL o LNFP III, lo que sugiere que otras fucosiltransferasas independientes de los sistemas *Se* y *Le* pueden estar involucradas [43,47,51]. Por otra parte, también se han encontrado HMOs  $\alpha$ 1-2-fucosilados en la leche de mujeres no secretoras, lo que podría deberse a la acción de otra enzima como la FUT1 [52].

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios sobre la variabilidad en la composición de los HMOs de la leche materna incluyendo diferentes países alrededor del mundo. Basándose en los resultados obtenidos de dichos estudios [39,47,53-56], Castanys et al. [42] identificaron el porcentaje de madres secretoras y no secretoras en diferentes países y lo plasmaron en la representación que se muestra en la Figura 5.

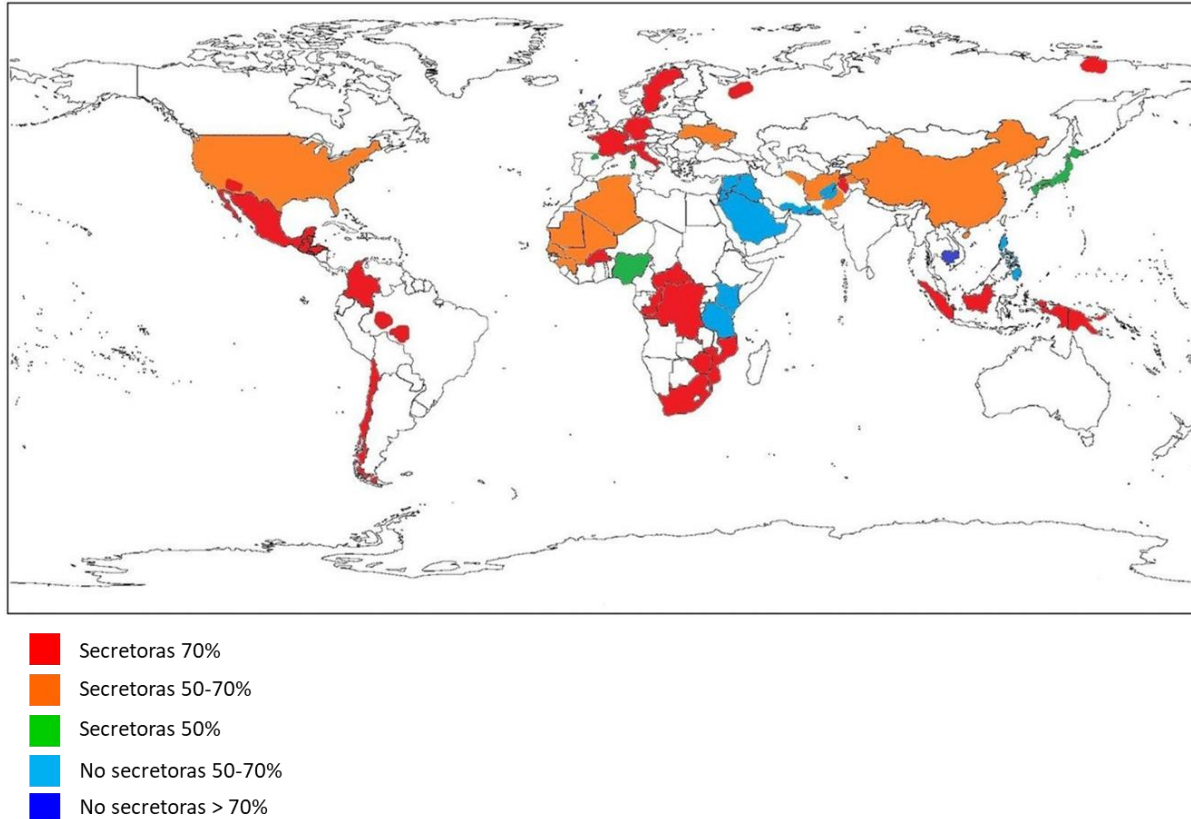


Figura 3. Distribución geográfica de madres secretoras y no secretoras representando cada color el rango de frecuencia en diferentes países. Modificado de [42].

### 2.2.3 Variabilidad entre especies de mamíferos en el perfil de oligosacáridos de la leche.

Además de en la leche humana, se han detectado también numerosos oligosacáridos en la leche madura y en el calostro de otros mamíferos. Actualmente existen datos de mamíferos placentarios y de otras especies como los monotremas y los marsupiales.

- *Monotremas* (Subclase *Prototheria*): Son los mamíferos más primitivos y son ovíparos. Dentro de este grupo encontramos animales como los equidnas y los ornitorrincos. En ambos casos la leche se caracteriza por tener una baja cantidad de lactosa [57] y un elevado contenido de estructuras fucosiladas. En el caso de los equidnas, los oligosacáridos mayoritarios son fundamentalmente di- y trisacáridos, concretamente

sialil- lactosas y fucosil-lactosas; en este último caso fundamentalmente la 2'-FL y la DFL. En los ornitorrincos el oligosacárido principal es la DFL [58].

- *Marsupiales (Subclase Metatheria)*: se diferencian de los mamíferos placentarios en que su período de gestación es bastante más corto por lo que nacen más pequeños y con cierto grado de inmadurez, sin embargo, el período de lactancia es más largo [58]. El contenido de lactosa en la leche de los marsupiales es, como ocurría con los monotremas, bastante bajo. Por el contrario, la concentración de oligosacáridos es alta en comparación con la leche de otros mamíferos y presenta una gran variabilidad en función de la etapa de lactancia. Los oligosacáridos principales son galactosiloligosacáridos con una longitud de cadena que puede variar de tres a ocho unidades [58].
- *Mamíferos placentarios (Subclase Eutheria)*: Después del ser humano, los mamíferos placentarios más estudiados en relación con su contenido en oligosacáridos han sido los animales domésticos (ver Tabla 1 para la comparativa entre leche humana frente a leche bovina). En este caso, la concentración en oligosacáridos es más baja y presenta una menor complejidad estructural: en la leche bovina y porcina se han encontrado sólo unas 30-40 estructuras diferentes [59,60] frente a las 200 identificadas en la leche humana. Los compuestos fucosilados son menos frecuentes y son mayoritarias las estructuras sialiladas [42]. La leche de vaca contiene alrededor de 1-2g/L de oligosacáridos libres en calostro y 0.1g/L en leche madura [61]. Tanto en la leche de vaca como de oveja [62], el 70% de los oligosacáridos están sialilados. En un estudio se han encontrado niveles traza de 2'-FL en la leche de vaca [63] y también se han detectado algunas estructuras fucosiladas en la leche de cabra [64]. Los sialiloligosacáridos son igualmente mayoritarios en leche porcina, aunque se han identificado hasta 6 estructuras fucosiladas [60].  
En el caso de los primates no humanos, como ocurre en la leche humana, la cantidad de oligosacáridos es menor que la de lactosa, pero las estructuras son, menos complejas que en la leche humana encontrándose unos 130 compuestos en el chimpancé y 50 en el gorila [41]. Asemejándose a la leche humana, aproximadamente el 50% de las estructuras



## INTRODUCCIÓN

en la leche de chimpancé están fucosiladas [42]. Se ha sugerido que los polimorfismos en los grupos sanguíneos observados en los humanos podrían haberse heredado de los grandes primates los cuales también podrían haber visto afectado su perfil de oligosacáridos por la expresión de ciertas glicosiltransferasas [65].

En los osos, la leche se caracteriza por contener bajas concentraciones de lactosa en comparación con los oligosacáridos [66] y se ha podido detectar la presencia de 2'-FL [67,68]. En la leche de coatí, la lactosa es más abundante que en la de oso [58] y la 2'-FL se ha identificado como el oligosacárido mayoritario [67]. Otros mamíferos placentarios como los elefantes presentan una elevada concentración de oligosacáridos con al menos 4 estructuras acídicas y 7 neutras [69], con ausencia de 2'-FL [42].

En general, las principales diferencias entre los oligosacáridos de leche humana frente a los oligosacáridos de otras especies, especialmente las domésticas como la cabra o la vaca son: 1) la relación de oligosacáridos fucosilados/no fucosilados es relativamente alta en leche humana, 2) las estructuras neutras están presentes en la leche humana a mayor concentraciones que las ácidas, y 3) la leche humana es más rica en cadenas Tipo I mientras que otros mamíferos tienen un predominio de cadenas tipo II [42].

Tabla 1. Principales diferencias en la composición de oligosacáridos de la leche humana vs. leche bovina.

Características de los oligosacáridos	Leche Humana 	Leche bovina 
Concentración leche madura	5-15g/L	0.1g/L
Diversidad estructural	Nº compuestos= 150-200 Estructuras complejas	Nº compuestos= 30-40 Estructuras sencillas
Oligosacáridos mayoritarios	Fucosilados	Sialilados

### 2.3 Historia sobre la investigación de los HMOs.

La historia sobre la investigación de los HMOs (Figura 6) comienza a finales del siglo XIX, fecha en la que las tasas de mortalidad infantil eran alarmantes oscilando entre el 20 y el 30% en el primer año de vida. Sin embargo, se observó que los bebés amamantados tenían una probabilidad mucho mayor de supervivencia y una menor incidencia de diarrea infecciosa y de muchas otras enfermedades que los bebés alimentados con fórmulas. Este hecho motivó un mayor interés acerca de la composición de la leche humana y en concreto de la fracción de carbohidratos de expertos en diferentes campos como la Pediatría, la Microbiología o la Química.

En 1886, Escherich, pediatra y microbiólogo austriaco, publicó una monografía acerca de la relación entre las bacterias intestinales y la fisiología de la digestión en lactantes [40,70]. Unos años más tarde, en 1900, Moro y Tissier encontraron diferencias en la composición bacteriana en las heces de los lactantes amamantados en comparación con los lactantes alimentados con biberón [40,70].

No sólo pediatras y microbiólogos mostraban su interés en la leche materna, sino que expertos en otros campos como la Química también comenzaron a estudiar la composición en carbohidratos de la leche humana. Así, en 1888 Eschbach señaló que la leche humana no contenía el mismo tipo de lactosa que la leche de vaca [71]. Poco después, Deniges descubrió que la lactosa en humanos y la leche bovina era idéntica pero la leche humana contenía una fracción de carbohidratos que aún no había sido identificada [71]. Más de 40 años después, Polonowski y Lespagnol, junto con Montreuil, fueron capaces de caracterizar esta fracción de carbohidratos y la llamaron "Ginolactosa" [72]. Dicha fracción era insoluble en metanol, contenía nitrógeno y hexosaminas y estaba compuesta por varios componentes. Unos años más tarde, en 1954, Polonowski y Montreuil utilizando la cromatografía en papel bidimensional por primera vez, pudieron separar la "ginolactosa" en oligosacáridos individuales identificando las primeras dos fucosillactosas (2'-FL y 3'-FL), desconocidas hasta entonces [73]. En años posteriores y de forma paralela, los grupos de Montreuil en Francia y de Richard Kuhn en Alemania, descubrieron y caracterizaron más de una docena de HMOs individuales [40].

## INTRODUCCIÓN

En 1926, Schönfeld observó que la fracción de suero de la leche humana contenía un factor del crecimiento para *Lactobacillus Bifidus*. Posteriormente, Kuhn y György, pudieron confirmar que dicho "factor bífido" eran realmente oligosacáridos [74-76]

Alrededor de 1960, Watkins comenzó a investigar los sistemas sanguíneos ABO y Secretor. Algunos HMOs se mostraron como determinantes del grupo sanguíneo. En 1967, Grollman y Ginsburg demostraron que la 2'-FL no está presente en la leche producida por mujeres no secretoras [77]. Estas investigaciones promovieron el desarrollo de técnicas como la combinación de la filtración en gel con la cromatografía en capa fina para lograr la separación y caracterización de los HMOs; Kobata y Ginsburg han sido investigadores muy influyentes en este aspecto. En los últimos 60 años se han desarrollado nuevos métodos en este campo.

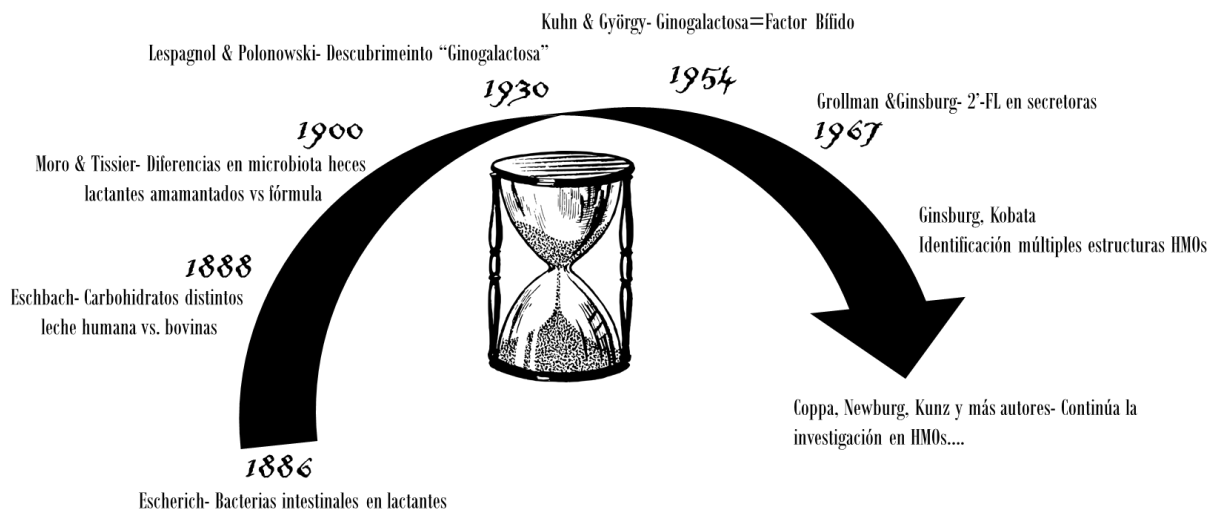


Figura 4. Cronología de grandes eventos en la historia de la investigación de los HMOs en las últimas décadas.

### 2.4 Metabolismo de los HMOs.

A lo largo de los años 1980 y comienzo de los 90, Sabharwal et al. fueron los primeros en demostrar la presencia de los HMOs en las heces de los bebés amamantados [78-80]. Diferentes estudios, tanto *ex vivo* como *in vivo*, demostraron que los HMOs resisten el bajo nivel de pH existente en el estómago; a nivel intestinal también son resistentes a la acción de las enzimas



pancreáticas y del borde en cepillo [81,82]. Todas estas evidencias sugieren que los HMOs son capaces de llegar al intestino delgado distal y el colon casi inalterados. Una vez en el intestino grueso, los HMOs pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal o directamente excretados en heces.

Por otra parte, ya en 1996, Rudloff demostró la presencia de HMOs en la orina de los bebés alimentados con leche materna [83]. Estudios posteriores en madres lactantes y sus bebés y realizados con oligosacáridos marcados con  $^{13}\text{C}$  demostraron que aproximadamente un 1% de los HMOs ingeridos eran detectados en la orina de dichos bebés [84,85] lo cual confirmaba que los HMOs procedentes de la leche materna podían ser absorbidos a nivel intestinal y pasar a la circulación del lactante donde podrían pasar varias horas antes de ser excretados en orina. De hecho, en un trabajo recientemente publicado en el que se analizaron muestras de orina y de plasma de 16 bebés lactantes sanos alimentados con leche materna así como muestras de leche de sus madres mediante diversas técnicas cromatográficas se observó que ciertos HMOs de bajo peso molecular como la 2'-FL, 3'-FL o Lacto-N-tetraosa (LNnT) son absorbidos intactos pasando a la circulación sanguínea y excretados en orina sin sufrir ninguna modificación metabólica en una proporción que se correlacionan con su ingesta desde la leche materna [86].

### 2.5 Funciones biológicas de los HMOs en los recién nacidos.

Una vez descrito el metabolismo de los HMOs, se pueden distinguir dos tipos de efectos en función del lugar donde actúen. Por una parte, se distinguen efectos locales a nivel intestinal y por otra parte, puesto que aproximadamente un 1% de los HMOs son absorbidos y pasan a la circulación sanguínea accediendo a otros tejidos y órganos diferentes como el hígado, cerebro, aparato urinario o respiratorio [87], también podrían ejercer efectos a nivel sistémico. A continuación, se describen cada una de las funciones de los HMOs identificadas hasta el momento:

## INTRODUCCIÓN

### 2.5.1 Prebióticos.

Según la definición de Robertfroid los prebióticos son "ingredientes fermentados de manera selectiva que dan lugar a cambios específicos, en la composición y/o actividad de la microflora gastrointestinal, confiriendo beneficios sobre el bienestar y la salud del huésped" [88]. Como ya se describió en el metabolismo de los HMOs, una vez ingeridos, éstos llegan prácticamente inalterados a la parte más distal del intestino delgado y al colon (Figura 7) y tan sólo un 1% puede absorberse y pasar a la circulación sistémica. Por ello se ha postulado que los HMOs pueden ser utilizados por la microbiota intestinal y posiblemente ejercer una función prebiótica.

Los primeros datos de que las bifidobacterias eran dominantes en las heces de los bebés amamantados datan de 1900. Actualmente, tras diversos estudios se puede decir que las diferencias entre la microbiota de bebés alimentados con leche materna o con fórmulas infantiles parece que no sólo radican en el predominio de las bifidobacterias o lactobacilos sino en la presencia y ausencia de otros géneros bacterianos. En general los bebés amamantados poseen una comunidad microbiana intestinal menos compleja y más estable que los bebés alimentados con fórmulas [89].



Figura 5. Acción prebiótica de los HMOs

## INTRODUCCIÓN

Así, diversas investigaciones han demostrado que los HMOs sirven de sustratos metabólicos para determinadas bacterias. Se ha observado que algunos miembros seleccionados del género *Bifidobacterium* que se encuentran comúnmente en los lactantes como *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*B. infantis*) y *B. bifidum* pueden utilizar los HMOs como fuentes de carbono [90]. Otro dato interesante es que se ha observado que el que las madres sean secretoras y que, por lo tanto, sean capaces de producir HMOs  $\alpha$ 1-2-glucosídico-fucosilado afecta a la comunidad intestinal de bifidobacterias de los lactantes [91]. Por su parte, *B. longum* subsp. *longum* y *B. breve* apenas utilizan los HMOs para su crecimiento [43]. No sólo ciertas bifidobacterias sino también algunos miembros del género *Bacteroides* [92] son capaces de metabolizar HMOs con alta eficiencia, al contrario que otros géneros como *Escherichia*, *Clostridia*, *Eubacteria*, *Enterococos* [93]. Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que la capacidad de diversas especies bacterianas para utilizar ciertos HMOs depende de la expresión de las enzimas específicas necesarias para su degradación [94-97]. En un reciente estudio *in vitro* con un modelo de intestino se ha demostrado el papel de la 2'-FL como prebiótico observándose una alteración en la composición de la microbiota intestinal hacia una abundancia de bacterias productoras de butirato [98].

Por ello se podía decir que diferentes cepas bacterianas tendrían preferencia por ciertos HMOs en concreto y, en consecuencia, diferentes perfiles de HMOs podrían dar lugar al desarrollo de distintas comunidades bacterianas a nivel intestinal. Sin embargo, no existen datos clínicos en humanos para confirmar esta hipótesis.

### 2.5.2 Agentes anti-adhesivos.

Además de actuar como prebióticos y favorecer así el crecimiento de la flora bacteriana beneficiosa frente al crecimiento de organismos patógenos, los HMOs juegan un importante papel en la prevención de infecciones por el bloqueo directo de patógenos víricos y bacterianos (Figura 8) [37,52], al imitar estructuralmente a los receptores de las superficies celulares que median la entrada en la célula de dichos patógenos [99,100]. Muchos patógenos víricos o bacterianos se adhieren a la superficie de la mucosa intestinal mediante interacciones ligando-

## INTRODUCCIÓN

receptor para así colonizar o invadir al huésped y causar la enfermedad. Los patógenos pueden expresar lectinas que se unen a glicanos presentes en la superficie intestinal del huésped o al contrario, algunos microorganismos expresan glicanos que se unen a las lectinas en las células del huésped [101]. Por ejemplo, ciertas cepas de *Escherichia coli* se unen a glicanos que contienen restos de manosa; por su parte, otras cepas de *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori* se unen a glicanos sialilados [102]. También se han descrito mecanismos de fijación mediados por glicanos para muchos virus como los norovirus o rotavirus [103]. Pues bien, algunos HMO se parecen a los glicanos de la superficie celular de la mucosa y sirven como receptores señuelo solubles para los patógenos bloqueando su unión a la superficie intestinal y reduciendo así el riesgo de infecciones [104,105]. En estudios *in vitro* se ha demostrado que HMOs tanto fucosilados como sialilados pueden inhibir dicha interacción entre patógenos y huésped. Asimismo, se ha demostrado *in vitro* que la Lacto-N-tetraosa (LNT), o su derivado fucosilado Lacto-N-Fucopentaosa I (LNFPI), pueden inhibir el crecimiento de estreptococos del grupo B [106]. Además, la presencia de 3'-FL en la leche materna se ha correlacionado inversamente con la abundancia de estreptococos del grupo B en lactantes [107].

Uno de los casos del que se tienen datos más claros acerca de la actuación de los HMOs como anti-adhesivos son las infecciones por *Campylobacter jejuni*, una de las causas más comunes de diarrea bacteriana y mortalidad infantil [108,109]. *C. jejuni* se une a células epiteliales cultivadas a través glicanos  $\alpha$ 1-2-fucosilados (Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R) [108]. Así, en estudios en ratones se ha visto que la adición de HMOs  $\alpha$ 1-2-fucosilados bloquea la unión de *C. jejuni* a células cultivadas pudiendo así reducir la colonización por dicha bacteria. Un estudio realizado en México mostró que la expresión de HMOs  $\alpha$ 1-2-fucosilados en la leche materna se correlacionaba con una menor incidencia de diarrea causada por *C. jejuni* y *Calicivirus* [109].

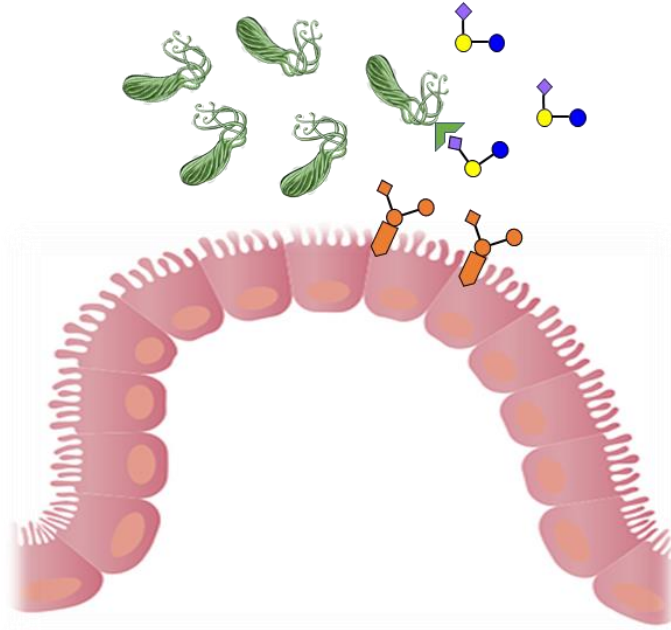


Figura 6. Mecanismo de acción del efecto de bloqueo de patógenos en la mucosa intestinal de los HMOs.

Como se comentó anteriormente, algunos microorganismos expresan glicanos que se unen a las lectinas en las células del huésped. Por ejemplo, es el caso del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que expresa en su superficie una glicoproteína gp120 que facilita su unión a una lectina tipo C, la DC-SIGN (en inglés: *Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non- integrin*) de las células dendríticas humanas, presente en las mucosas del huésped [110-112]. Aunque la DC-SIGN se une a la gp120 [113,114], tiene una mayor afinidad por los antígenos del grupo sanguíneo Le [115,116] por lo que los HMOs que contienen dichos antígenos competirían con la gp120 para unirse a DC-SIGN *in vitro* [117]. De hecho, se ha demostrado que los HMOs que contienen antígenos Le inhiben la transferencia de VIH-1 a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de manera más eficiente que otros HMOs [115].

Este efecto antiadhesivo no sólo tiene lugar a nivel intestinal, sino que también se da en las vías respiratorias superiores. En los lactantes que reciben leche materna existe una menor incidencia de otitis media causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Haemophilus influenzae* y también tienen un menor riesgo de desarrollar infecciones por el virus RSV por sus siglas en inglés: *Respiratory syncytial virus*) [118,119]. De nuevo, los HMOs son capaces de

## INTRODUCCIÓN

bloquear la unión lectina-glicano empleada por estos patógenos para iniciar la infección [120,121]. La función antiadhesiva de los HMOs se puede extender a ciertos parásitos protozoarios como *Entamoeba histolytica*, que causa disentería amebiana o absceso hepático amebiano [122].

Algunos investigadores sugieren que diferentes HMOs parecen proteger frente a distintos patógenos lo que explicaría la gran variedad de estructuras presentes en la leche materna. Por ello, diferencias individuales en la composición de HMOs de la leche por factores genéticos u otros podrían dar lugar a un nivel de protección diferente en los bebés alimentados con leche materna, aunque se necesitan estudios clínicos para su confirmación [89].

### 2.5.3 Agentes antimicrobianos.

Además de como prebióticos y agentes anti-adhesivos los HMO podrían actuar frente a los patógenos de una forma más directa como agentes antimicrobianos (Figura 9).

Recientemente, Lin et al. han demostrado en trabajos *in vitro* que *Streptococcus agalacticae* (*Streptococcus* del grupo B; GBS) no puede proliferar en presencia de HMOs [106]. Los bebés infectados por GBS pueden desarrollar sepsis, neumonía y meningitis. En cuanto al mecanismo de acción parece ser que GBS produce una glicosiltransferasa que incorpora HMOs específicos en su membrana lo que detiene la proliferación de la bacteria siendo los HMO no sialilados los que tienen un mayor efecto bacteriostático sobre GBS. En otra investigación *in vitro* se ha demostrado que dicho efecto no se observa sólo para *S. agalacticae* sino también para otros patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii* [123].

Esta acción antimicrobiana se ha observado también en hongos, como es el caso de *Candida albicans*. Se ha observado que los HMOs reducen significativamente la invasión de células epiteliales intestinales prematuras humanas por *C. albicans* de forma dosis-dependiente [124]; dicho efecto parece estar relacionado con un retraso en el crecimiento de las hifas y la morfogénesis del hongo.

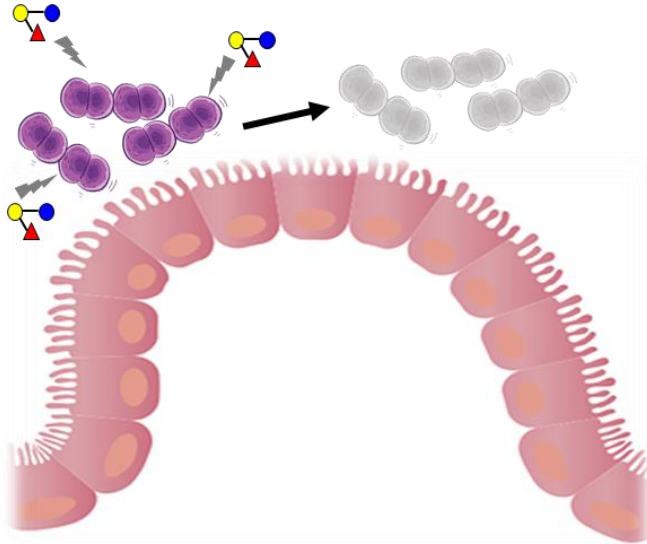


Figura 7. Acción antimicrobiana de los HMOs

### 2.5.4 Moduladores de las células epiteliales intestinales

Algunos estudios *in vitro* sugieren que los HMOs también podrían modular la expresión de los glicanos presentes en la superficie de las células intestinales (glicocálix) que constituyen el principal sitio de unión de los patógenos (Figura 10). Un estudio realizado por Angeloni et al. demostraron que la 3'-SL, uno de los HMOs sialilados mayoritarios, era capaz de modular el perfil de glicanos de la superficie de células CaCo-2 [101], de forma que se observó un menor número de residuos de Neu5Ac con uniones  $\alpha$ 2-3 y  $\alpha$ 2-6 así como menos moléculas de Fuc y Gal. Este efecto se produjo por una reducción en la expresión de diferentes enzimas que median la unión de los glicanos. Estas modificaciones producidas por la 3'-SL a nivel de la superficie celular de dichas células epiteliales condujeron a una reducción del 90% en las uniones de *E. Coli* enteropatogénica (EPEC por sus siglas en inglés: *Enteropathogenic Escherichia coli*).

Estos resultados han sido apoyados por Kuntz et al. con otros estudios *in vitro* en los que se ha demostrado que los oligosacáridos aislados de leche humana inhibían el crecimiento celular, e

## INTRODUCCIÓN

inducían la diferenciación y apoptosis en líneas de células epiteliales intestinales mediante la alteración de genes relacionados con el crecimiento celular [125,126].

También se ha demostrado que los HMOs reducen la invasión a nivel del tracto urinario de *E. Coli* uropatogénica (UPEC por sus siglas en inglés: *Uropathogenic Escherichia coli*). Aunque inicialmente se pensó que este efecto era debido a las propiedades antiadhesivas de los HMOs, sino que parece ser que los HMOs interactúan con las células epiteliales y las hacen más resistentes a los ataques de UPEC. Los HMOs suprimen la señalización intracelular de los procesos de apoptosis que la célula epitelial reproduce cuando UPEC intenta destruirlas. Este efecto depende de la estructura del HMOs de forma que sólo los HMOs sialilados como la 3'-SL son eficaces [127].

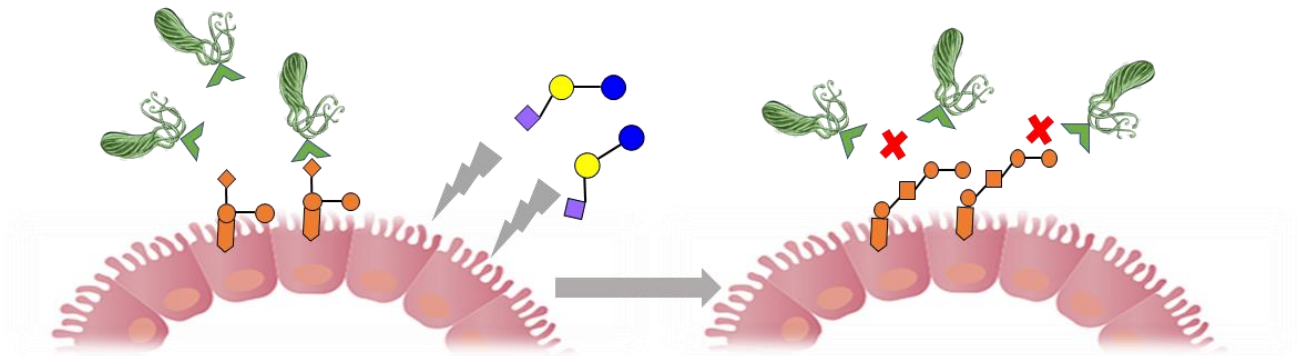


Figura 8. Cambios a nivel del glicocáliz de las células intestinales por acción de los HMOs

A pesar de todos estos resultados se necesitan más investigaciones que expliquen receptores y procesos de señalización son utilizados por los HMOs para desencadenar estos cambios a nivel de la expresión genética.



### 2.5.5 Inmunomoduladores.

Todas las acciones descritas hasta ahora podrían afectar indirectamente al sistema inmune del recién nacido. Sin embargo, los HMOs también pueden actuar directamente modulando la respuesta inmune. Esta acción la pueden desarrollar tanto localmente en el intestino, en las células del tejido linfóide asociado a las mucosas (MALT, por sus siglas en inglés: *Mucosa-associated lymphoid tissue*) (Figura 11) como a nivel sistémico ya que se ha demostrado que entre 1-2% de los HMOs ingeridos pasan a circulación sanguínea [43].

Distintos estudios *in vitro* han demostrado que los HMOs pueden alterar la respuesta inmune. Recientemente se ha observado que los HMOs sialilados reducen la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6 en macrófagos estimulados por LPS [87]. Dado el resultado de otro estudio *in vitro* [128], Eiwegger et al. sugirieron que los HMOs sialilados pueden influir en la maduración de los linfocitos promoviendo un cambio en la respuesta de las células T hacia una producción de citoquinas Th1/Th2 más equilibrada y, por tanto, a un nivel más bajo de reactividad [43].

Por otra parte, en un reciente estudio clínico [129] en recién nacidos sanos en el que se evaluó el efecto de una fórmula infantil suplementada con 2'-FL en biomarcadores de la función inmune, se observó que las concentraciones plasmáticas de las citoquinas inflamatorias IL-1, IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y el antagonista antiinflamatorio del receptor de IL-1 eran significativamente más altas en el grupo control que en el grupo que recibió la fórmula con 2'-FL.

Por su parte, en los cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés: *Peripheral blood mononuclear cell*) de los bebés y estimulados por el RSV *ex vivo*, se observaron también concentraciones más bajas de citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y una tendencia a una menor concentración de IL-1R $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  que los lactantes alimentados con la fórmula de control [130].

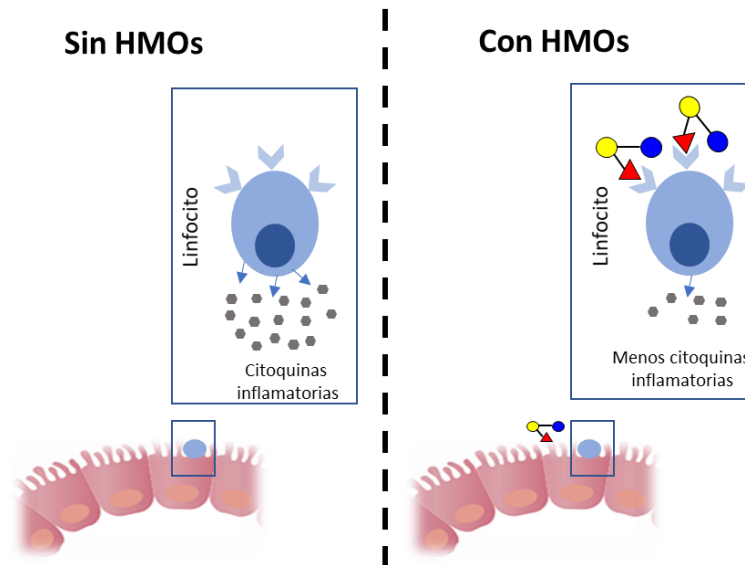


Figura 9. Efecto inmunomodulador de los HMOs en las células de la mucosa intestinal.

Aún se desconoce a través de qué receptores y procesos de señalización los HMOs pueden influir en la producción de citoquinas de los linfocitos o en la estimulación de los macrófagos. Las comunicaciones celulares tanto del sistema inmune innato como adquirido están principalmente mediadas por lectinas. De nuevo, los HMOs podrían modificar las interacciones proteína (lectina)-carbohidrato; de hecho, se ha demostrado que los HMOs pueden interactuar con diversas lectinas humanas como las selectinas, siglecs y galectinas [89]. Las siglecs se unen a oligosacáridos sialilados con uniones  $\alpha 2-3$  ó  $\alpha 2-6$ . Las galectinas se unen a galactosas terminales como las que forman parte de las lactosaminas y las selectinas se unen a determinados oligosacáridos sialilados y fucosilados de los grupos Le [131]. Por ejemplo, las selectinas median los procesos de adhesión de los leucocitos a las células endoteliales y su extravasación hacia los lugares de inflamación; otras selectinas median la formación y activación de los complejo plaquetas-neutrófilos involucrados en la fagocitosis y producción de especies de oxígeno reactivas [132]. Pues bien, los HMOs se asemejan a los determinantes a los que se unen fisiológicamente estas selectinas y se ha demostrado que pueden reducir tanto la adhesión de los leucocitos [133] como la formación y activación de los complejos plaquetas-neutrófilos [134].

## INTRODUCCIÓN

### 2.5.6 Protección frente al desarrollo de alergias.

En relación con el papel inmunomodulador de los HMOs, algunos científicos están comenzando a investigar el potencial terapéutico de las HMO para las alergias.

En un modelo de ratón de alergia alimentaria, el tratamiento de ratones sensibilizados con ovoalbúmina con 1 mg de 2'-FL ó 6'-SL redujo significativamente los síntomas propios de la alergia a alimentos como la diarrea e hipotermia, así como un aumento significativo en las células T secretoras de IL-10 en los parches de Peyer en alérgicos ratones y una estabilización de los mastocitos [135].

En un estudio clínico retrospectivo en bebés amamantados con alto riesgo hereditario de desarrollar alergia, se sugirió que los niños nacidos por cesárea pueden tener un menor riesgo de eczema asociado a IgE a los dos años de edad cuando reciben oligosacáridos de leche dependientes de FUT2 [136].

### 2.5.7 Protección frente a Enterocolitis necrotizante.

La enterocolitis necrotizante (NEC por sus siglas en inglés: *Necrotizing Enterocolitis*) es el trastorno más frecuente y potencialmente mortal que afecta el intestino de los bebés prematuros pero su etiología sigue sin conocerse aún. Se ha observado que los bebés prematuros alimentados con leche humana tienen un riesgo menor de desarrollar NEC [137].

Las principales razones que pueden desencadenar NEC podrían ser la hipoxia perinatal o una infección posnatal leve; por ellos se pueden producir daños leves en la mucosa alterando la función de la barrera epitelial intestinal. La proliferación de las bacterias y productos bacterianos (lipopolisacárido, LPS) en la mucosa induce la producción endógena de citoquinas proinflamatorias como el factor activador de plaquetas y el TNF- $\alpha$ , las cuales aumentan aún más la permeabilidad del intestino. Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno producidas por los neutrófilos activados y la xantina oxidasa epitelial intestinal pueden causar necrosis tisular severa y la ruptura de la barrera intestinal.

## INTRODUCCIÓN

Pues bien, los HMOs pueden actuar en distintos puntos relacionados con la patogénesis de NEC. Así, pueden modificar las interacciones bacteria-huésped y la composición de la microbiota intestinal al actuar como anti-adhesivos o prebióticos respectivamente. También pueden alterar la adhesión bacteriana modificando la superficie de la célula epitelial intestinal, que representa los principales sitios de unión para patógenos.

Estudios *in vitro* y *ex vivo* también sugieren que los HMOs reducen la infiltración y activación de neutrófilos, así como la producción de ROS, que son eventos clave en la patogénesis de NEC. En un estudio preclínico en el que se usó un modelo de rata neonatal con NEC, se observó que la administración oral de diversos HMOs en una concentración similar a la encontrada en la leche humana, mejoraba significativamente la supervivencia y la severidad de la enfermedad; además se sugirió que dicho efecto protector de los HMOs frente a NEC podrían atribuirse a la disialillacto-N-tetraosa (DSLNT) [138]. En otra investigación preclínica con el mismo modelo de rata se demostró que la 2'-FL también reducía significativamente la severidad de la patología [139]. Otros investigadores han demostrado que la 2'-FL protege contra NEC en un modelo ratón neonatal; la administración de 2'-FL disminuyó la producción de marcadores proinflamatorios y preservó la mucosa intestinal. Esta acción de la 2'-FL responde a una regulación positiva de la molécula vasodilatadora, óxido nítrico endotelial sintasa que ayuda a mantener la perfusión intestinal [140].

Hasta la fecha, no se han realizado estudios de intervención en recién nacidos prematuros humanos que hayan intentado correlacionar la presencia o ausencia de HMO con incidencia de NEC.

### 2.5.8 Desarrollo cerebral.

A lo largo de los años diversos estudios han demostrado la influencia de la lactancia materna en el desarrollo cognitivo en niños. Se ha demostrado que los adolescentes que recibieron leche materna como principal fuente de alimento en la etapa inicial de la vida, tienen una corteza cerebral parietal más gruesa, así como un mayor coeficiente intelectual si se comparan con otros

## INTRODUCCIÓN

adolescentes que fueron alimentados con fórmulas infantiles [141]. La hipótesis más aceptada es que este efecto se debe a la composición de la leche materna, aunque otros estudios también señalan la interacción madre-recién nacido durante el período de lactancia como otra posible razón de la mejora en el desarrollo cognitivo [142]. Así, se ha sugerido que ciertos componentes de la leche humana desempeñan un papel en el desarrollo del cerebro. Entre ellos, los ácidos grasos [143] o el colesterol [144] podrían tener un efecto importante a nivel cognitivo. Por ejemplo, en el caso de los ácidos grasos, el ácido docosahexaenoico (DHA por sus siglas en inglés: *Docosahexaenoic acid*) es el ácido graso poliinsaturado de cadena larga más abundante en la leche humana y se acumula rápidamente en el cerebro. Se ha demostrado que los bebés que son amamantados con leche materna presentan niveles más altos de DHA en el cerebro que los que recibieron leche de fórmula [145]. Por lo tanto, el DHA ha despertado un intenso interés en los últimos años y se ha postulado como candidato para la mejora cognitiva en los lactantes [146,147].

Otros componentes de la leche humana que podrían jugar un papel importante en el desarrollo cerebral son los HMOs, tanto sialilados como fucosilados. Diferentes estudios han detectado la presencia de dichos compuestos tanto en la orina como en la sangre de bebés amamantados [83-86], lo que indica que son absorbidos a nivel intestinal pasando al torrente circulatorio y potencialmente, a cualquier tejido u órgano del cuerpo como el cerebro.

Los HMOs sialilados, en particular, el Neu5Ac libre, ha sido el más estudiado desde un punto de vista cognitivo. La principal razón para ello es que el Neu5Ac es el único ácido siálico que se encuentra en cerebro; existen otros ácidos siálicos como el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) que se puede encontrar en ciertos órganos de mamíferos no humanos excluyendo el cerebro. Esta investigación se inició con el estudio de otros compuestos sialilados, los gangliósidos. Estudios pioneros en la década de 1980 mostraron que el ácido siálico exógeno podía incorporarse a los gangliósidos y las glicoproteínas cerebrales cuando se inyecta por vía intraperitoneal [148]. Wang et al. investigaron el destino metabólico del Neu5Ac marcado con <sup>14</sup>C administrado por vía intravenosa en lechones y concluyeron que una fuente exógena de ácido siálico podría atravesar la barrera hematoencefálica e incorporarse a diferentes tejidos [149]. Carlson y House también demostraron que el ácido siálico administrado por vía intraperitoneal o

## INTRODUCCIÓN

por vía oral tenía un impacto importante en la concentración de gangliósidos y glucoproteínas cerebrales [150]. En otro estudio preclínico con crías de rata se demostró que diferentes dosis de ácido siálico administrado por vía oral a través de una dieta sólida entre los días 17 y 31 posnatales tenía un efecto en la concentración de los gangliósidos corticales siendo mayor en aquellos animales en los que se usó como fuente de ácido siálico el casein-glicomacropéptido [151].

Sin embargo, no sólo se han llevado a cabo estudios sobre la influencia de la suplementación con Neu5Ac en la concentración de gangliósidos y glicoproteínas cerebrales, sino que también se han realizado numerosos esfuerzos para intentar describir los efectos de dicha suplementación en la etapa inicial de la vida sobre el desarrollo cerebral y cognitivo. En un estudio realizado por Morgan y Winick [148] se inyectó, por vía intraperitoneal, ácido siálico libre o glucosa (grupo de control) a crías de ratas desnutridas desde el día posnatal 14 hasta el destete. Los resultados mostraron que, además de una mayor concentración de Neu5Ac en gangliósidos y glicoproteínas cerebrales, las ratas que recibieron el ácido siálico libre también obtuvieron mejores resultados que el grupo control en las pruebas de comportamiento. Wang et al. [152] utilizaron un modelo preclínico con lechones para evaluar el efecto de un sustituto de leche de cerda suplementado con diferentes dosis de casein-glicomacropéptido, que contiene ácido siálico, durante 35 días después del destete observándose un aumento en la concentración cerebral de ácido siálico y mejoras en tareas de memoria y aprendizaje. Algunos de estos resultados se contradicen con investigaciones recientes realizadas por el otro equipo de trabajo de Mudd et al.; en ellas se observó que una suplementación con sialilactosa entre el día posnatal 2 al día 32 provocaba un considerable aumento de los niveles de ácido siálico en el hipocampo, la corteza prefrontal y el cuerpo calloso [153], pero no dio lugar a ningún efecto significativo sobre la memoria de reconocimiento [154]. Previamente, Jacobi [155] había demostrado en un estudio con lechones que una dieta suplementada con 6'-SL y 3'-SL aumentaba la cantidad de ácido siálico unido a los gangliósidos en varias áreas del cerebro.

Por su parte los HMOs fucosilados no han sido tan ampliamente estudiados desde un punto de vista cognitivo como los sialilados. Sin embargo, recientemente se han publicado diferentes trabajos intentando dilucidar el efecto la 2'-FL. Matthies et al. realizaron un pionero estudio ex

## INTRODUCCIÓN

vivo pionero en el que se demostró que tanto la Fuc como la 2'-FL mejoran la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas inglés: *Long term potentiation*) en cortes de hipocampo de rata [156]. Un efecto similar se había observado previamente en un estudio *in vivo* en ratas después de la inyección intrahippocampal con estos compuestos [157]. Recientemente se ha demostrado que la suplementación oral con 2'-FL mejora las capacidades de aprendizaje y la plasticidad sináptica [158] en roedores adultos que recibieron una dieta enriquecida en 2'-FL durante varias semanas; en una publicación posterior del mismo grupo de trabajo se postula la mediación del nervio vago en aquellos procesos que relacionan la 2'-FL con procesos de memoria y aprendizaje en roedores [159].

Aunque el mecanismo de acción a través del cual los HMOs podrían ejercer esta función a nivel cerebral no está aún claro existen varias hipótesis. Por una parte, podría ser que los HMOs llegaran directamente al cerebro tras ser absorbidos ejerciendo una acción local; por otra parte, se ha sugerido, como en el artículo mencionado anteriormente [159], que dichos compuestos podrían interaccionar sobre eje intestino-cerebro (GBA por sus siglas en inglés: *Gut-brain axis*) y mediar una acción a nivel cognitivo. El GBA (GBA) es una red bidireccional compleja (Figura 12) que se comunica entre el cerebro y el tracto gastrointestinal y modula las funciones ambos niveles [160]. Esta conexión entre el intestino y el cerebro está impulsada por vías neuronales y mecanismos inmunes y endocrinos. Se sabe que el nervio vago es uno de los encargados de comunicar señales desde el sistema digestivo y los órganos al cerebro y viceversa [161]. Se postula que uno de los principales factores capaces de modular el GBA es la microbiota intestinal [162] mediante diferentes metabolitos, como los ácidos grasos de cadena corta o los neurotransmisores. A pesar de estas hipótesis han de realizarse más estudios de investigación para poder clarificar este punto.

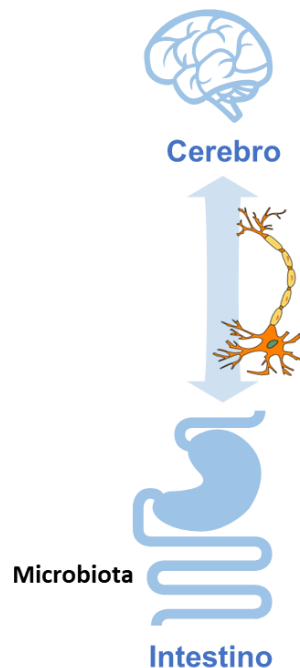


Figura 10. Estructura del eje Intestino-Cerebro (GBA).

### 2.6 Estudios clínicos con HMOs.

Como se ha podido deducir de las secciones anteriores, la mayor parte de la investigación en HMOs se ha centrado en la realización de estudios *in vivo*. Sin embargo, también se han llevado a cabo diversos estudios observacionales que han proporcionado importantes hallazgos. Lewis observó que las Bifidobacterias colonizan antes el intestino de los bebés alimentados con leche de madres secretoras que en los bebés de madres no secretoras; a su vez las heces que contenían mayor nivel de Bifidobacterias tenían concentraciones más bajas de HMOs y mayores de lactato [91]. Posteriormente, en un estudio piloto se confirmaba que los niños de madres secretoras poseen una microbiota más abundante en *Bifidobacterium* y *Bacteroides* que los niños de madres no secretoras [163]. Otros estudios parecen relacionar el gen FUT2 y el desarrollo de alergia en etapas posteriores de la vida en niños que recibieron leche materna [136]. En relación con el efecto inmunomodulador de los HMOs, Kuhn et al. evaluaron los efectos de éstos en la supervivencia de niños no infectados nacidos de madres infectadas con VIH: se observó una asociación entre altas concentraciones de HMOs fucosilados en la leche materna con menores



## INTRODUCCIÓN

tasas de mortalidad [164]. En otro estudio realizado por Morrow, se determinó que la incidencia de diarrea provocada por *Campylobacter* o *Calicivirus* era menor en aquellos bebés alimentados con leche con altos niveles de HMOs fucosilados en posición 2 [109].

Por su parte, los estudios clínicos dirigidos a evaluar el efecto de los HMOs en humanos son muy escasos y han estado principalmente orientados a describir el efecto de dichos compuestos en la respuesta inmune de los sujetos evaluados.

Uno de dichos estudios [129] se llevó a cabo en Estados Unidos y consistió en un estudio prospectivo, aleatorizado, controlado, multicéntrico de crecimiento y tolerancia que se realizó en recién nacidos a término sanos. Se establecieron cuatro grupos de estudio, tres grupos de bebés alimentados con fórmulas infantiles y un grupo de referencia de bebés que recibieron leche materna. Dentro de las fórmulas hubo una fórmula control sin HMOs y dos fórmulas de estudio con diferentes dosis de 2'-FL: 0.2 g 2'-FL/L y 1.0 g 2'-FL/L; ambas fórmulas también contenían galactoligosacáridos (GOS) hasta alcanzar un nivel de 2.4 g/L de prebióticos. El seguimiento de los bebés se realizó durante 119 días. Según los resultados obtenidos, no hubo diferencias en el crecimiento entre grupos y todas las fórmulas mostraron buenos resultados en cuanto a parámetros de tolerancia (consistencia de heces, reflujo). Tampoco se observaron diferencias significativas en la absorción relativa de 2'-FL entre los bebés que recibieron leche materna y los que recibieron fórmulas con 2'-FL. Este estudio clínico dio lugar a un sub-estudio [130] en el que se evaluó el efecto de las fórmulas infantiles suplementadas con 2'-FL sobre biomarcadores de la función inmune en dichos bebés. Para ellos se extrajeron muestras de sangre a las seis semanas de edad. Se midieron un total de 10 citoquinas proinflamatorias en plasma. Según los resultados obtenidos las fórmulas suplementadas con 2'-FL dieron lugar a perfiles de citoquinas inflamatorias plasmáticas circulantes y los perfiles de citoquinas inducidas por el virus RSV similares a los niveles en los bebés amamantados. Los resultados obtenidos mostraron que la fórmula que contiene 2'-FL fue bien tolerada por los bebés y no se observaron diferencias significativas en el patrón de crecimiento entre los grupos de estudio [165].

Puccio et al. publicaron también los resultados obtenidos de un ensayo aleatorizado, controlado y multicéntrico realizado en Italia y Bélgica [166]. El principal objetivo del estudio era medir los

## INTRODUCCIÓN

efectos de la alimentación con fórmulas infantiles suplementadas con dos HMOs, 2'-FL y LNnT, sobre el crecimiento infantil, la tolerabilidad, la microbiota intestinal, así como el uso de medicamentos. Se incluyeron dos grupos de estudio: lactantes alimentados con una fórmula infantil con 2'-FL (1.0 g/L) y LNnT (0.5 g/L) y lactantes que recibieron una fórmula infantil sin HMOs hasta los 6 meses de edad. Hubo un grupo de referencia con bebés amamantados hasta los 3 meses. Se demostró que la fórmula infantil con 2'-FL y LNnT era segura, bien tolerada y proporcionaba un crecimiento adecuado a la edad. También se observó una reducción de la morbilidad y el uso de medicamentos en los bebés alimentados con fórmula con HMOs. En un trabajo posterior, los mismos autores observaron que el perfil de la microbiota intestinal de los lactantes alimentados con una fórmula con 2'-FL y LNnT era significativamente diferente de la de los lactantes alimentados con fórmula sin HMOs y más parecida a la de aquellos amamantados al pecho materno: mayor abundancia de *Bifidobacterium* y menor proporción de *Escherichia* y *Peptostreptococcaceae*. También se evaluó el perfil cuantitativo de los metabolitos en heces (aminoácidos, ácidos grasos de cadena corta y algunos ácidos orgánicos) y se observó que era similar al de los bebés amamantados.



### *3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*



## HIPOTESIS

Los HMOs se han postulado como uno de los componentes biológicamente activos de la leche materna. Múltiples estudios han demostrado científicamente que los HMOs ejercen distintos efectos tras ser ingeridos. Dichos efectos van desde una acción prebiótica hasta un efecto a nivel cognitivo. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que un aporte exógeno de HMOs pueden modificar el desarrollo cerebral, no solo a nivel composicional sino también a nivel cognitivo. En el caso de estudios preclínicos, la mayor parte han consistido en estudios agudos o a corto plazo. El mecanismo de acción que media este efecto no ha podido aun ser explicado completamente.

La composición de la leche materna está determinada genéticamente pero también puede estar influida por otros factores como un parto prematuro, la hora del día y otras variables maternas como la edad, peso, paridad, hábito de fumar, peso o dieta. Actualmente existen escasos estudios que hayan evaluado el efecto del sobrepeso, obesidad o estado metabólico como el desarrollo de DMG, sobre la composición y contenido de HMOs de la leche materna.

### 1ª Hipótesis:

La presencia de oligosacáridos en la leche materna contribuye al desarrollo cerebral de la descendencia con efectos cognitivos positivos a largo plazo.

#### Justificación:

- Estudios previos con ácido siálico (Neu5Ac) sugieren su importancia en el desarrollo cerebral.
- Estudios previos con 2'-FL sugieren su importancia en el desarrollo cerebral.

### 2ª Hipótesis:

El IMC pregestacional y el estado metabólico de la madre condiciona el perfil de HMOs de la leche materna modulando el desarrollo cognitivo de los niños.

#### Justificación:

- Apenas se conocen los efectos del sobrepeso, obesidad o DMG durante la gestación sobre el perfil y contenido de HMOs en la leche materna y en algunos casos, los resultados que se han obtenido son contradictorios.

## OBJETIVOS

- 
- 1. Demostrar el efecto de los HMOs, concretamente de la 2'-FL y la 6'-SL, sobre la función cognitiva a largo plazo en modelos animales.*
- 
- 2. Explorar en humanos la influencia del sobrepeso, obesidad y la diabetes gestacional en embarazadas sobre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL en la leche materna.*
- 
- 3. Determinar la influencia de las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL presentes en la leche materna sobre el neurodesarrollo durante los primeros 18 meses de vida.*
-

## *4. MATERIAL Y MÉTODOS*





## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos anteriores se plantearon tres experimentos: dos de ellos utilizaron modelos preclínicos con roedores y el tercero se basó en un estudio clínico con parejas de madres y bebés.

### Objetivo 1

- **Experimento 1.** *Evaluación de los efectos de una suplementación oral con 2'-FL en crías de rata durante el período de lactación en el desarrollo cognitivo.*
- **Experimento 2.** *Evaluación de los efectos de una suplementación oral con 6'-SL en crías de rata durante el período de lactación en el desarrollo cognitivo.*

### Objetivo 2 y 3

- **Estudio clínico materno-infantil.** *Evaluación del efecto del estado metabólico materno sobre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL en la leche humana y su potencial influencia en el neurodesarrollo de los niños. Estudio clínico PREOBE.*

A continuación, se describirán los materiales y métodos utilizados para los experimentos 1 y 2 así como para el estudio clínico materno-infantil.

### 4.1 Experimento 1.

#### Evaluación de los efectos de una suplementación oral con 2'-FL en crías de rata durante el período de lactación en el desarrollo cognitivo.

##### 4.1.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas preñadas de la raza Lister Hooded (Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, Francia). Tanto dichas ratas como sus crías se mantuvieron en condiciones ambientales óptimas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad ( $50 \pm 10\%$ ) e iluminación (12 horas de ciclo luz/oscuridad). Los protocolos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Granada, España) y el experimento se realizó de acuerdo con la normativa española y europea para el cuidado y uso de animales de experimentación para la investigación.

##### 4.1.2 Diseño experimental.

Las ratas preñadas se alojaron individualmente en jaulas y se mantuvieron con un consumo de agua y comida (Harlan Teklad, dieta 2018; Harlan Laboratories; Indianapolis, IN) *ad libitum* hasta el parto. En el día 3 postnatal, las crías fueron separadas de sus madres y sexadas. Las crías machos se distribuyeron aleatoriamente en camadas de 6 crías y cada camada fue asignada a una madre adoptiva.

El diseño experimental del experimento 1 se puede ver en la Figura 13. Se establecieron dos grupos experimentales, el grupo 2'-FL (n=30 crías) y el grupo control (n=30 crías), los cuales recibieron un suplemento oral hasta el destete. Las ratas del grupo 2'-FL recibieron dosis diarias 1 g/kg de peso corporal de 2'-FL (Inalco Pharmaceuticals; San Luis Obispo, CA) repartidas en 4 tomas. El grupo de control recibió agua, siguiendo el mismo patrón de suplementación que el grupo 2'-FL. Para las tomas (4 veces al día), las crías se cogían directamente de sus jaulas donde

## MATERIAL Y MÉTODOS

se encontraban con sus madres adoptivas. Dicha suplementación se realizaba en aproximadamente 5 minutos por camada, asegurando así que el tiempo en que las crías se separaban de sus madres era sólo de 20 min/día. En ningún momento se produjo rechazo por parte de las madres adoptivas tras la manipulación.

Después del destete, todas las ratas se alimentaron con dieta AIN-93M [167]. Cuando los animales tenían alrededor de 6 semanas de edad, se evaluaron con pruebas de comportamiento clásicas (n=12 ratas/grupo). Se realizaron tres tipos de pruebas que se utilizan habitualmente para evaluar las habilidades de aprendizaje y memoria de las ratas: Laberinto acuático de Morris, Prueba de reconocimiento de objeto nuevo y Laberinto en Y con brazo bloqueado.

Al año, se llevó a cabo una medida electrofisiológica de potenciación a largo plazo, LTP, en ciertas ratas (n=10 ratas/grupo), y el resto de los animales se volvió a someter a la misma evaluación de comportamiento con los tests clásicos que se realizaron en edad temprana (Laberinto acuático de Morris, Prueba de reconocimiento de objetos y Laberinto en Y).

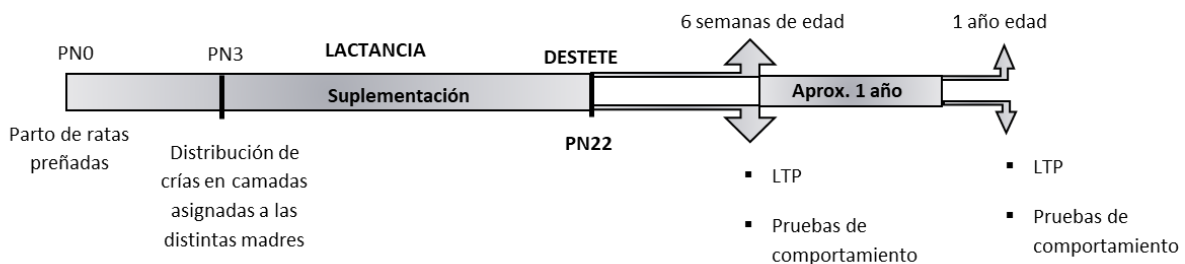


Figura 11. Diseño experimental Experimento 1.

Para poder estudiar la LTP justo después del destete, se utilizó otro grupo de crías. El procedimiento seguido desde la llegada de las ratas preñadas hasta el destete de las crías, incluida la suplementación oral con 2'-FL o agua durante el período de lactancia, fue el mismo que se describe en el procedimiento anterior, aunque en este caso la suplementación oral continuó hasta las 6 semanas de edad. En este punto, los animales se sometieron a la LTP *in vivo* (n=10 ratas/grupo).

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

Tras los estudios, todos los animales fueron sacrificados por una sobredosis de anestesia (pentobarbital de sodio, 50 mg/kg de peso corporal), de acuerdo con el procedimiento aprobado por el Comité de Ética.

### *4.1.3 LTP “In vivo”.*

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral al 4% a una dosis de 1 ml/100 g de peso corporal. Una vez anestesiados, a los animales se les implantaron electrodos de estimulación y de registro en el hipocampo para medir la LTP *in vivo*. Se siguieron las coordenadas estereotáxicas [168] para implantar los electrodos estimulantes en la vía colateral-comisura de Schaffer del hipocampo dorsal (3,5 mm lateral y 3,2 mm posterior a Bregma). Además, a los animales se les implantaron cuatro electrodos de registro en el estrato radiatum ipsilateral debajo del área CA1 (2.5 mm lateral y 3.6 mm posterior a Bregma). Posteriormente, los animales fueron estimulados registrándose el potencial postsináptico excitatorio de campo (fEPSP por sus siglas en inglés: *Excitatory postsynaptic potential*) [169].

En el caso de los animales jóvenes, se llevó a cabo una segunda estimulación el día después de recibir el primero para lograr un mayor potencial de campo sináptico [170]. Tras la estimulación de alta frecuencia (HFS por sus siglas en inglés: *High-frequency stimulation*), se registraron los fEPSP durante 30 minutos. En los días siguientes, se realizaron sesiones adicionales de 15 minutos de medida de potencial. Puede encontrarse una descripción más detallada de los procedimientos para medida de LTP en diversas publicaciones científicas [171].

### *4.1.4 Pruebas de comportamiento.*

Se usó un sistema de video (Sony Camera SSC-G213A) para registrar todos los ensayos con animales. El comportamiento de los animales se analizó mediante el software analítico Viewer (Biobserve GmbH; St. Augustin, Alemania).

## MATERIAL Y MÉTODOS

- **Test de reconocimiento de objeto nuevo (NORT por sus siglas en inglés: Novel Object Recognition Test).**

La tarea de reconocimiento de objetos se utiliza para evaluar la memoria de reconocimiento que involucra tanto a la corteza perirrina como al hipocampo. Esta tarea se basa en la tendencia de los roedores hacia la novedad. Al enfrentarse a dos objetos, un roedor sano muestra instintivamente más interés por un nuevo elemento (objeto nuevo) explorándolo en primer lugar y durante más tiempo, que por un objeto que ya ha explorado (objeto familiar) al que reconoce y recuerda. Las desviaciones de este comportamiento denotan deficiencias cognitivas.

La tarea se realizó en una cámara abierta de plástico negro (40 cm × 40 cm × 50 cm) llamada arena. En primer lugar, se llevó a cabo un proceso de habituación de la rata a la arena, en el cual se dejó que el animal explorase la arena vacía durante 20 minutos en 3 días consecutivos. Al cuarto día, tuvo lugar la fase de adquisición en la que la rata se introdujo en la arena en donde se encontraba un par de objetos designados como familiares y se dejó que el animal los explorase durante 10 minutos. La fase de retención se produjo 24 horas después de la de adquisición. En esta nueva fase uno de los objetos familiares se reemplazó por un objeto nuevo y se permitió al animal explorarlos por un tiempo de 5 minutos (Figura 14). Se consideró que los animales estaban explorando los objetos cuando se acercaban a ellos con sus bigotes a una distancia de aproximadamente 1–2 cm o los lamían; no se consideró exploración aquellos casos en los que el animal se sentaba sobre los objetos [172]. El tamaño de los objetos se adaptó a la edad de los animales. La variable clave en este test es el tiempo que la rata pasa explorando cada objeto, nuevo o familiar, durante la fase de retención.



Figura 12. Descripción de las distintas fases de la prueba de reconocimiento de objeto nuevo (NORT).

### ▪ **Laberinto en Y con brazo bloqueado.**

La prueba del laberinto en Y se usa para medir la memoria en roedores y también se basa en la tendencia natural de estos animales a explorar nuevos entornos. Los roedores normalmente prefieren explorar un nuevo brazo del laberinto en lugar de regresar a uno que ya fue visitado previamente. Varias áreas del cerebro, como el hipocampo, el septum, el prosencéfalo y la corteza prefrontal están involucradas en esta tarea.

Para esta tarea se utilizó una estructura de acero inoxidable con tres brazos iguales (50 cm × 20 cm × 10 cm) e interconectados en 120°. Se eligió una variante del laberinto en Y llamada laberinto en Y con brazo bloqueado. Para ello se siguió el protocolo definido por Dellu [173] con alguna modificación. En la fase de adquisición, uno de los brazos del laberinto, el que se denominó brazo nuevo, estaba cerrado con una pared vertical. Así, en esta fase, el animal solo podía explorar los dos brazos que permanecían abiertos; el tiempo de esta fase era de unos 15 minutos. Tras esta primera fase, el animal se devolvía a la jaula durante 4 horas. A continuación, tenía lugar la fase de retención en la que la pared vertical que anteriormente bloqueaba el brazo nuevo se retiró quedando los tres brazos disponibles para ser explorados por la rata. La duración de la fase de retención era de 5 minutos (Figura 15). Las variables analizadas en esta fase de retención fueron el tiempo que el animal tardaba en acceder al brazo nuevo (latencia) y el tipo de brazo, nuevo o familiar, elegido para ser explorado en primer lugar.

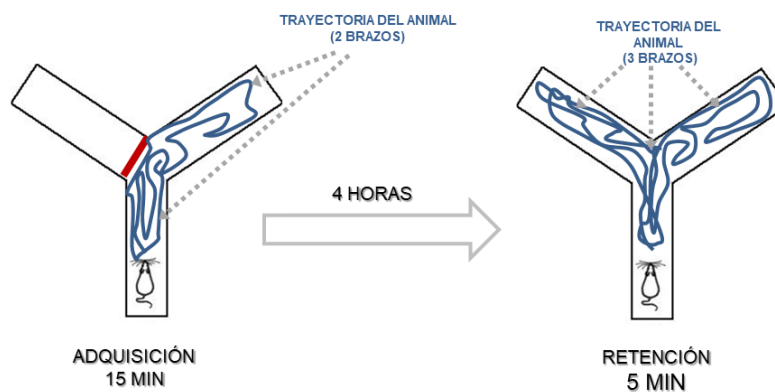


Figura 13. Descripción de las fases de la prueba de laberinto en Y con brazo bloqueado.

### ▪ **Laberinto acuático de Morris.**

Este paradigma se utiliza principalmente para medir la memoria espacial que está ligada al hipocampo.

En esta tarea se utilizó una piscina (150 cm de diámetro) y una plataforma (50 cm de diámetro) de acero inoxidable. En una fase inicial de entrenamiento, la rata tenía que aprender dónde estaba ubicada una plataforma oculta dentro de la piscina llena de agua ( $26\pm 1^\circ\text{C}$ ) con la ayuda de pistas externas. Cada rata se introdujo en la piscina 4 veces al día, partiendo de cuatro posiciones diferentes (4 ensayos/animal/día). La rata permanecía en el agua hasta que encontraba la plataforma o, si esto no sucedía, hasta que transcurría 1 minuto. La variable que se registraba en esta fase era el tiempo que el animal tardaba en encontrar la plataforma en cada ensayo.

Un día después de terminar la fase de entrenamiento, que podía durar varios días, tenía lugar la prueba en sí que consistía en retirar la plataforma e introducir a la rata en la piscina dejando explorarla durante 1 minuto. Las variables analizadas en esta fase de prueba fueron el tiempo que el animal tardaba en llegar (latencia) a la posición en la que estaba colocada la plataforma en la fase de entrenamiento, el tiempo que el animal pasaba en el cuadrante de la piscina donde la plataforma había estado ubicada durante el entrenamiento (cuadrante objetivo) y el tiempo pasado en el cuadrante opuesto al cuadrante objetivo.

#### 4.1.5 Análisis estadístico.

Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron utilizando los paquetes estadísticos SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.) y GraphPad (GraphPad Inc., California, EE. UU.). Los resultados se han presentado como media  $\pm$  SEM. Para las comparaciones entre grupos se utilizó una prueba t de Student. Para las medidas de LTP y las curvas de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA por sus siglas en inglés: *Analysis of variance*). Las variables categóricas se analizaron mediante tablas de contingencia utilizando la prueba de Fisher. El nivel de significación se estableció en  $P < 0.05$  para todas las pruebas.



## 4.2 Experimento 2.

### Evaluación de los efectos de una suplementación oral con 6'-SL en crías de rata durante el período de lactación en el desarrollo cognitivo.

#### 4.2.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas preñadas de la raza Sprague-Dawley (Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, Francia). Tanto dichas ratas como sus crías se mantuvieron en condiciones ambientales óptimas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $55\pm 10\%$ ) e iluminación (12 horas de ciclo de luz/oscuridad). Los protocolos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Granada, España) y el experimento se realizó de acuerdo con la normativa española y europea para el cuidado y uso de animales de experimentación para la investigación.

#### 4.2.2 Diseño experimental.

El diseño experimental del experimento 2 se puede ver en la Figura 16.

La leche de rata contiene oligosacáridos sialilados, fundamentalmente, 3'-SL y 6'-SL [174]. En la leche de rata, el nivel de ácidos siálicos alcanza su punto máximo en el día posnatal 9 (PN9) y disminuye bruscamente hasta el día posnatal 15 (PN15), para luego hacerlo más ligeramente hasta el final de la lactancia [175]. Para evitar este pico de ácido siálico, se utilizaron dos cohortes de ratas preñadas con un desfase de 13 días en la fecha de parto. Los animales se mantuvieron con un consumo de agua y dieta de alimentación para gestación, lactancia y crecimiento (Teklad Global 18% Protein Diet 2018) *ad libitum* hasta el parto. La primera cohorte ( $n = 20$ ), que en adelante se nombrarán madres adoptivas, se mantuvo con sus crías hasta el día posnatal 16 (PN16). Las crías nacidas de la segunda cohorte de madres ( $n = 27$ ) permanecieron con ellas hasta el día posnatal 3 (PN3). Ese día, estas crías de 3 días de edad se separaron de sus madres

## MATERIAL Y MÉTODOS

biológicas, fueron pesadas, sexadas y distribuidas aleatoriamente en camadas de 10 crías (5 machos y 5 hembras). A continuación, las crías de la primera cohorte de madres que para esa fecha tenían 16 días de edad fueron separadas de sus madres y sustituidas por las nuevas camadas de 3 días de edad. Las madres de la primera cohorte de ratas pasarían así a ser las madres adoptivas de las camadas de 3 días. Las madres adoptivas y sus camadas fueron distribuidas en 3 grupos experimentales de 4 madres cada uno y 10 crías por madre. Dichas madres aceptaron sin problema a las nuevas camadas y las amamantaron el resto del período de lactación.

Dado que el contenido de ácido siálico en la leche de rata alcanza los valores más bajos a partir del día PN16, las crías amamantadas por madres adoptivas recibieron menos cantidad de ácido siálico que las crías amamantadas en condiciones normales por sus madres biológicas. Se establecieron tres grupos experimentales. Para compensar esta deficiencia de ácido siálico en la leche de rata de las madres adoptivas, un grupo de crías recibió un suplemento oral de ácido siálico libre (Neu5Ac) desde PN3 hasta el destete y el segundo grupo recibió la misma cantidad molar de Neu5Ac administrada en forma conjugada como 6'-SL. Estos dos grupos recibieron por tanto los mismos niveles de ácido siálico que habitualmente están presentes en la leche de rata, pero de dos fuentes diferentes, libre o conjugada. El tercer grupo de crías, grupo control, recibió una suplementación oral de agua. El principal objetivo de dicho modelo fue evaluar los efectos de una ingesta adecuada de ácido siálico durante la lactación, así como la influencia de la estructura bioquímica en la absorción.

Las crías fueron amamantadas por las ratas adoptivas y a la vez recibieron la suplementación dividida varias tomas al día. Tras el destete, todas las madres y dos crías por camada fueron sacrificadas con una sobredosis intraperitoneal de anestésico. Los cerebros de las crías sacrificadas se separaron en hemisferios. Uno de los hemisferios se tomó para la determinación del contenido de ácido siálico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés: *High performance liquid chromatography*) y el otro hemisferio se usó para determinar la expresión de la proteína de adhesión celular neuronal (NCAM por sus siglas en inglés: *Neural Cell Adhesion Molecule*) y de su forma polisialilada (PSA-NCAM por sus siglas en inglés: *Polysialylated-NCAM*) en la corteza frontal mediante la técnica Western blot.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las crías que no se sacrificaron fueron evaluadas con pruebas de comportamiento clásicas como el test de reconocimiento de objetos y el laberinto en Y.

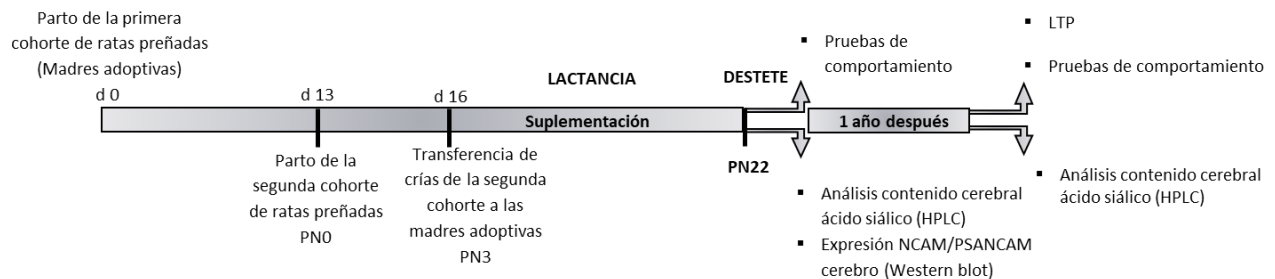


Figura 14. Diseño experimental Experimento 2.

Tras concluir dicha evaluación, las crías se mantuvieron durante 1 año con una dieta de alimentación estándar. Al año de edad, los animales machos fueron utilizados para las medidas electrofisiológicas de LTP, mientras que las hembras fueron sometidas nuevamente a pruebas de comportamiento para evaluar los efectos de dicha suplementación en el aprendizaje y memoria a largo plazo. Finalmente, estas ratas fueron sacrificadas y sus cerebros analizados por HPLC para determinar el contenido de Sia en el cerebro en la edad adulta.

### 4.2.3 Cálculo de la dosis de ácido siálico.

La concentración de ácido siálico en la leche de rata varía a lo largo del período de lactación alcanzando ( $\approx 8\text{mg/ml}$ ) en el día PN9 y cayendo hasta niveles más bajos el día PN 15 [175] a partir del cual se suele mantener. Para determinar los efectos del ácido siálico, se diseñó un modelo con tres grupos experimentales. En uno de ellos los animales recibieron menos ácido siálico que si hubieran tenido una lactancia normal con sus madres biológicas, es decir, se podrían considerar deficientes en ácido siálico. Los otros dos grupos recibieron los mismos niveles de ácido siálico que las crías amamantadas naturalmente, pero procedentes de dos fuentes distintas, como ácido siálico libre (Neu5Ac) o en forma conjugada como 6'-SL. La dosis diaria de ácido siálico a recibir

## MATERIAL Y MÉTODOS

se calculó en función del contenido de ácido siálico de la leche de rata (Figura 17.a), el peso corporal de las crías (Figura 17.b) y la ingesta de leche (Figura 17.c) durante la lactancia, de acuerdo con los datos encontrados en la literatura [175] y los datos de experimentos anteriores en el departamento. A partir de la información anterior, se calculó la dosis teórica de ácido siálico (mg/kg de peso/día) que las crías de rata normalmente recibirían de la leche de rata (Figura 17.d). Se prepararon soluciones de stock equimolares con Neu5Ac y 6'-SL. Se administraron volúmenes variables de estas soluciones madre a las crías por día para ajustar la dosis de ácido siálico diaria.

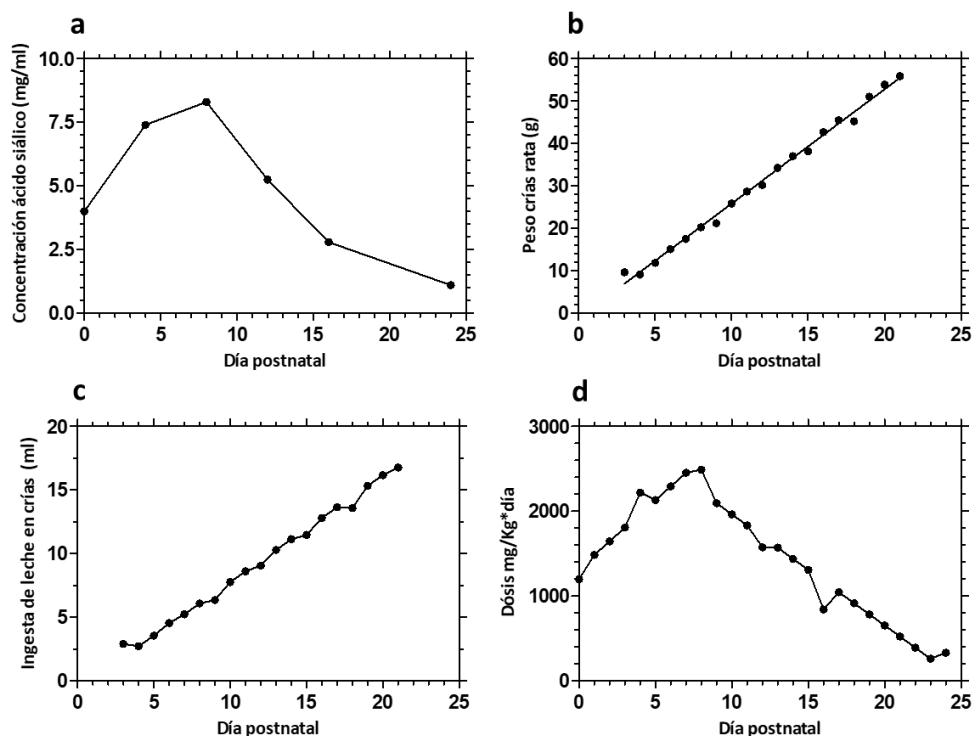


Figura 15. (a) Concentración de ácido siálico (mg/ml) en la leche de rata según la literatura [175]. (b) Datos experimentales sobre la evolución en el peso de crías de rata (g) desde el nacimiento hasta el destete. (c) Ingesta de leche de rata (ml) por parte de las crías desde el nacimiento hasta el destete de acuerdo a la literatura. (d) Dosis de ácido siálico (mg/kg/day) estarían recibiendo a lo largo de la lactación en base a los datos mostrados en las gráficas (a-c).

### 4.2.4 Determinación del contenido de ácido siálico en cerebro.

Los hemisferios cerebrales de las ratas se utilizaron para determinar la cantidad total de ácido siálico por HPLC. Tras la homogeneización del cerebro, se pesaron unos 35 mg y se resuspendieron en agua desionizada para alcanzar una concentración de 0,2 mg/ $\mu$ l. El Neu5Ac

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

se liberó por hidrólisis suave en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 N a  $80^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Después de filtrar y centrifugar durante 30 minutos a 10000 rpm, los sobrenadantes se usaron para derivatización con 5-(difluorometoxi)-2-mercapto-1H-bencimidazol (DMB) según lo descrito por Hara [176] con algunas modificaciones. 50  $\mu\text{L}$  de muestra y 50  $\mu\text{L}$  de reactivo DMB (DMB 8 mM, ácido acético 1.5 M, hidrosulfito de sodio 14 mM, 2-mercaptoetanol 0.8 M (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA)) se mantuvieron durante 2.5 h a  $50^\circ\text{C}$  en la oscuridad. A continuación, se inyectó un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de la solución derivatizada en un sistema de HPLC Alliance 2695 equipado con un detector de fluorescencia 474 de Waters (Mildford, MA, EE. UU.) según lo descrito por Martin et al. [177]. Se utilizó una columna LiChrosorb RP-18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4,6 mm) con un cartucho protector LiChrosorb RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), ambos de Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.). Los derivatizados se eluyeron isocráticamente usando metanol al 7% (v/v), acetonitrilo al 8% (v/v) en agua durante 40 minutos a un flujo de 0,9 ml min<sup>-1</sup>. Todas las inyecciones se realizaron a temperatura ambiente. Se monitorizó la fluorescencia del eluyente a 373 nm (longitud de onda de excitación) y 448 nm (longitud de onda de emisión). La ganancia se fijó en 1 y la atenuación en 64 para el detector de fluorescencia 474. También se inyectaron un conjunto de estándares (25–250 ng de Neu5Ac) con cada conjunto de muestras. Los datos fueron analizados mediante el software Millennium (Waters, Milford, MA, EE. UU.).

### 4.2.5 Western Blot.

Se homogeneizaron  $\approx$ 15-20 mg de muestra de corteza frontal de crías al destete (PN22) en un tampón (PBS, TritonX100 al 0,1% y cóctel inhibidor de proteasa de Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) Se centrifugó a 10.000 g durante 15 min y se recogió el sobrenadante. El contenido de proteína en la muestra se determinó usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Se cargaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína, diluida en PBS, en geles Criterion XT 4-20% Bis-Tris (Bio-Rad). La separación se llevó a cabo utilizando tampón MOPS (MOPS 0,05 M, base Tris 0,05 M, SDS 0,003 M, EDTA 0,8 mM) a 200 V durante 45 minutos. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 3,5 h usando una célula de transferencia de electroforesis Trans-Blot. Se analizaron seis muestras por grupo. Tras bloquear los sitios de unión no específicos

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

durante 1 hora con albúmina de suero bovino al 3% (BSA, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) en TBS-TritonX100 (Triton X100 al 0.025%, base Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6), las transferencias se incubaron durante toda la noche a 4°C con uno de los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-NCAM (Santa Cruz, CA, EE. UU.) a 1:2500; anti-PSA-NCAM (Millipore/Merck, Darmstadt, Alemania) a 1:1000. Todos los anticuerpos se diluyeron en TBS que contenía BSA al 1%. Después de tres lavados rápidos con TBS-TritonX100, las membranas de NCAM se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con HRP anti-IgG a 1:5000 (Sigma Aldrich) mientras que las de PSA-NCAM se incubaron con HRP anti-IgG (laboratorios Bethyl, Montgomery TX) a 1: 5000 por 2h. La  $\beta$ -actina se usó como control para la cuantificación y se detectó con un anticuerpo monoclonal (Sigma Aldrich, 1: 5000). Después de cinco lavados con TBS-TritonX100, se utilizó el sustrato Pierce Supersignal West-Pico (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se procedió a la cuantificación usando un sistema Chemidoc XRS de BioRad.

### *4.2.6 LTP "In vivo".*

Ver sección 4.1.3.

### *4.2.7 Pruebas de comportamiento.*

- **NORT.**

(Ver sección 4.1.4-Test de reconocimiento de objetos)

- **Laberinto en Y con brazo bloqueado.**

(Ver sección 4.1.4-Laberinto en Y con brazo bloqueado)

### ▪ Prueba en IntelliCage®.

La IntelliCage® (NewBehavior AG, Zurich, Suiza) es un sistema de prueba totalmente automatizado que se utiliza para analizar el comportamiento espontáneo y de aprendizaje de los roedores. Este sistema consiste en una jaula que presenta 4 esquinas. Cada esquina está equipada con 2 puertas motorizadas que se bloquean o permiten el acceso a biberones de agua colocados a cada lado de la esquina. Cuando una rata intenta acceder a través de cualquiera de las 2 puertas introduciendo el hocico (lo que se conoce en inglés como *nosepoke*), la interrupción de un sensor de haz de luz en cualquiera de las puertas activa la apertura de una u otra puerta y permite el acceso al biberón de agua correspondiente.

Unos transpondedores de identificación por radiofrecuencia (RFID por sus siglas en inglés: *Radio frequency identification*) se implantan debajo de la piel de la rata, lo que permite el reconocimiento individual de los animales. Así, las entradas de ratas en las esquinas se detectan a través de las antenas RFID ubicadas en dichas esquinas. Usando esta tecnología, se pueden implementar protocolos para evaluar las actividades de comportamiento de las ratas.

Los transpondedores RFID se implantaron en los animales y 1 día después éstos se introdujeron en la IntelliCage® (n=8ratas/grupo); se mantuvieron allí durante 2 semanas para la habituación a la jaula y la realización de la prueba. El proceso de habituación constó de diferentes etapas: 1 día de exploración libre con todas las puertas de acceso a los biberones abiertas; 5 días en los que las puertas se abrieron sólo cuando el animal visitaba la esquina correspondiente; en los 2 días siguientes, las puertas sólo se abrían si había un nosepoke en el lugar correcto (designado por el investigador); en los últimos 4 días, un nosepoke abría cualquier puerta pero sólo durante dos sesiones de 90 minutos por noche, permanecieron cerradas el resto de la noche y todo el día, para estimular el aprendizaje. Estas condiciones están recogidas por la literatura y no son perjudiciales para el animal.

La prueba consiste en medir las capacidades cognitivas de los animales cuando se restringía el acceso a los biberones en períodos de tiempo específicos. Durante dicha prueba, que duraba dos días, el acceso al agua se restringió a una esquina (esquina correcta) solo durante las dos sesiones al día. A cada rata se le asignó aleatoriamente una esquina correcta. Si la rata tocaba con la nariz

## MATERIAL Y MÉTODOS

cualquier otra esquina, no se abría ninguna puerta. Cada visita a la esquina asignada se contaba como una respuesta correcta, mientras que si se visitaba cualquier otra esquina distinta de la asignada se contaba como respuesta incorrecta, y la puerta no se abría. De esta forma, solo las ratas con habilidades cognitivas adecuadas eran capaces de aprender cuál era la esquina correcta en este paradigma de aprendizaje.

### 4.2.8 Análisis estadístico.

Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron utilizando los softwares SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.) Y GraphPad (GraphPad Inc, La Jolla, CA, EE. UU.). Los datos se han presentado como media  $\pm$  S.E.M. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba t de Student. Para NORT, Western blot y LTP se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA). Las variables categóricas como las respuestas en el laberinto en Y y la prueba en IntelliCage® se analizaron mediante una prueba de Fisher. El nivel de significación se estableció en  $p < 0.05$  para todas las pruebas.

## 4.3 Estudio clínico materno-infantil.

**Evaluación del efecto del estado metabólico materno sobre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL en la leche humana y su potencial influencia en el neurodesarrollo de los niños.**

**Estudio clínico PREOBE.**

### 4.3.1 Diseño del estudio.

El estudio PREOBE (*“Role of nutrition and maternal genetics on the programming of development of fetal adipose tissue”*) es un estudio prospectivo de casos y controles coordinado por el Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada (España). El protocolo del estudio clínico fue aprobado por los comités de ética médica del Hospital Clínico Universitario San Cecilio y el Hospital Universitario Materno-Infantil de Granada (España). Todos



## *MATERIAL Y MÉTODOS*

los participantes firmaron un consentimiento informado al comienzo del estudio. El ensayo se registró en [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov), identificador (NCT01634464).

El objetivo del estudio PREOBE es la identificación de biomarcadores genéticos y bioquímicos relacionados con la programación de la obesidad en las primeras etapas de la vida. Algunos resultados derivados de este ensayo clínico [178-181] ya han sido publicados. La población objeto de este estudio fueron mujeres embarazadas de 18 a 45 años de edad que se encontraban entre la semana 12 y 34 de gestación. Se establecieron 4 grupos de estudio, alcanzándose un tamaño de muestra final de 331 sujetos reclutados: mujeres sanas de peso normal ( $18.5 \leq \text{pIMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ ;  $n=132$ ), mujeres con sobrepeso ( $25 \leq \text{pIMC} < 30 \text{ kg/m}^2$ ;  $n=56$ ), mujeres obesas ( $\text{pIMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ;  $n=64$ ) y mujeres con DMG ( $\text{pIMC} \geq 18.5 \text{ kg/m}^2$ ;  $n=79$ ).

Fueron excluidos del estudio los sujetos que participaban en otros estudios clínicos, recibieron tratamiento farmacológico, consumían dieta vegana o padecían alguna de las siguientes enfermedades: diabetes pregestacional, hipertensión o preeclampsia, retraso del crecimiento intrauterino fetal, infección durante el embarazo, hipo/hipertiroidismo, enfermedades hepáticas o renales.

En el trabajo que se describe en este proyecto de tesis doctoral se incluyeron los datos del seguimiento del neurodesarrollo que se llevó a cabo en los niños hasta los 18 meses de edad. Concretamente, el neurodesarrollo de los lactantes se evaluó a los 6 y 18 meses de edad utilizando las Escalas de Bayley de Desarrollo Infantil, Tercera Edición (BSID-III). BSID-III evalúa cinco dominios del desarrollo: cognitivo, lenguaje, motor, comportamiento adaptativo y desarrollo socioemocional, los cuales se describen ampliamente en diferentes publicaciones [182,183]. El test BSID-III es adecuado para la evaluación de niños entre 1 mes y 42 meses de edad. El diagrama de flujo del presente estudio se muestra en la Figura 18.

A las madres participantes en el estudio PREOBE se les pidió que tomaran muestras de leche materna al mes del parto (leche madura) en alícuotas de 5 ml antes y después de cada toma de leche durante 1 día y las congelaran a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se entregó a las madres una pequeña nevera para que pudieran transportar dichas muestras de leche al hospital. A continuación, las muestras se mezclaron y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

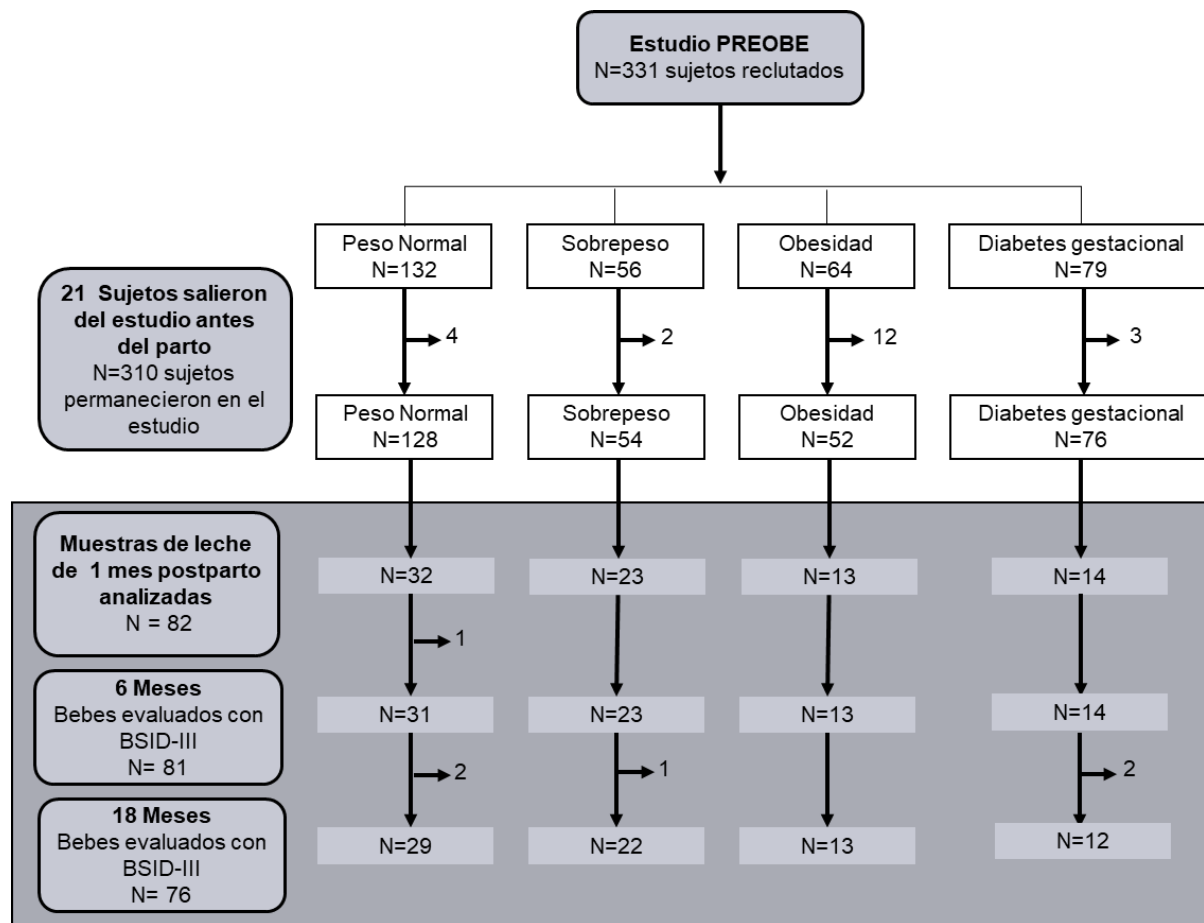


Figura 16. Diagrama de flujo de la determinación del contenido en 2'-FL y 6'-SL en leche materna y evaluación del desarrollo de los bebés dentro del estudio PREOBE.

#### 4.3.2 Análisis de HMOs en leche humana.

Se analizaron un total de 82 muestras de leche madura (1 mes postparto) por UHPLC-MS/MS ( en inglés: *Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer*) siguiendo el proceso descrito previamente por Santos-Fandila et al. [184] con algunas modificaciones. Las muestras de leche materna se descongelaron en un baño de agua a 37°C durante 10 minutos con agitación suave para evitar la separación de la fracción grasa. Se colocó una alícuota de 25 µl en un tubo Eppendorf con 500 µl de agua MilliQ, se agitó en vórtex durante 1 minuto y se filtró a través de filtros Amicon® (Merck) 10K 30 minutos a 8°C y 14,000 rpm.

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

El análisis cromatográfico se realizó utilizando una columna UHPLC BEH Amide (2.1x100 mm, tamaño de partícula 1.7  $\mu\text{m}$ ) de Waters. El caudal fue de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La columna se mantuvo a 25 $^{\circ}\text{C}$ , la muestra a 20 $^{\circ}\text{C}$  y el volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$ . Se usó una fase móvil con gradiente que consistía en una solución acuosa de amoníaco al 0,1% (v / v) (disolvente A) y amoníaco al 0,1% (v / v) en acetonitrilo (disolvente B). Las condiciones del gradiente fueron: 0.0-3.0 min, 10-25% A; 3,0-8,0 min, 25-40% de A; 8,0-8,1 min 40-10% de A; y 8.1-10.0 min 10% A para estabilizar las condiciones iniciales. El tiempo de ejecución total fue de 8,1 min, y el tiempo para reacondicionar la columna con 10% del disolvente A fue de 1,9 min. Como disolvente débil se utilizó una mezcla de 25 ml de agua y 75 ml de acetonitrilo, y como disolvente fuerte, una mezcla de 80 ml de agua y 20 ml de acetonitrilo. Las curvas estándar de cuantificación se prepararon con estándares externos de 2'-FL y 6'-SL (Inalco, > 95% de pureza) a concentraciones de 0.015, 0.1, 0.5, 2, 10 y 20 mg/L. Las muestras se cuantificaron utilizando una dilución apropiada dentro del rango dinámico lineal de la recta de calibración. Las concentraciones finales se obtuvieron aplicando el factor de dilución correspondiente.

### *4.3.3 Análisis estadístico.*

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete de software estadístico R para Windows (versión 3.4). Para comparar variables continuas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para datos distribuidos normalmente y el test de Kruskal-Wallis para variables no normales. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para las proporciones. Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar o frecuencias dependiendo del resultado. Se utilizaron comparaciones post hoc de Bonferroni o Dunn para identificar diferencias significativas entre los grupos.

Se realizaron análisis de correlación de Pearson y regresión lineal multivariante para evaluar la relación entre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL y las puntuaciones de las escalas del test BSDI-III. Para determinar qué factores de confusión deben considerarse en los resultados de BDSI-III en los análisis de regresión multivariantes, se compararon las condiciones de referencia entre los

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

grupos y aquellas variables que fueron estadísticamente diferentes entre los grupos se identificaron como factores de confusión.



## *5. RESULTADOS*



## 5.1 Experimento 1.

**Evaluación de los efectos de una suplementación oral con 2'-FL en crías de rata durante el período de lactación en el desarrollo cognitivo.**

### 5.1.1 LTP "In vivo".

Los resultados obtenidos en la prueba de LTP para ambas edades, animales jóvenes y adultos, se muestran en la Figura 19. Los valores de fEPSP fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en el grupo de animales que recibió suplementación con 2'-FL si lo comparamos con el grupo control a ambas edades.

Estos datos sugieren, por tanto, que la 2'-FL podría tener una acción moduladora sobre la plasticidad sináptica en ratas no sólo justo después de la suplementación (animales jóvenes), sino también al año de haberla recibido (animales adultos).

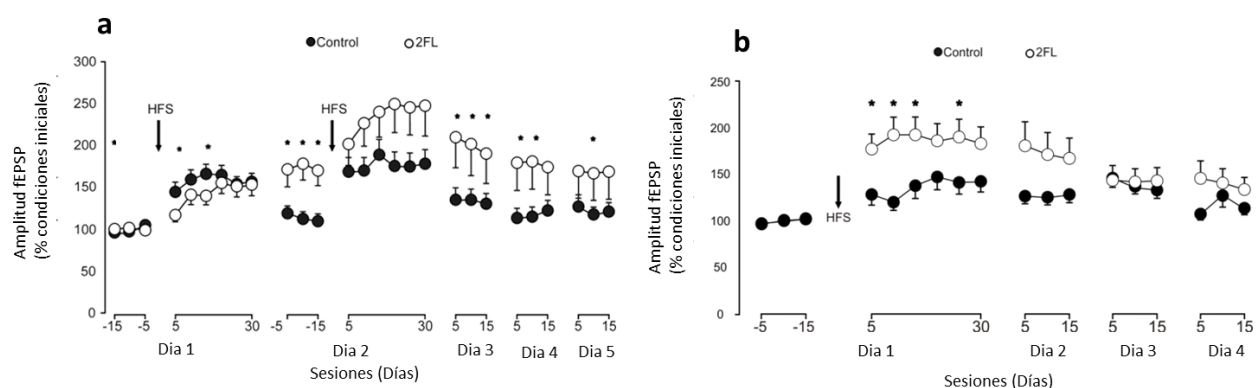


Figura 17. LTP. Potenciales experimentalmente evocados en los dos grupos de animales en estudio a las 6 semanas (a) y al año de edad (b).  $n = 10$  ratas por grupo. Los datos se recogieron antes y después de aplicar el estímulo (HFS) y se representan como media  $\pm$  SEM. Estudio estadístico con ANOVA; el \* indica diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

Dentro del procedimiento de LTP, es conveniente resaltar que los animales jóvenes requirieron dos estímulos para obtener una respuesta considerable, mientras que las ratas adultas alcanzaron grandes potenciales tras aplicar un sólo estímulo.



## RESULTADOS

### 5.1.2 Pruebas de comportamiento.

#### ▪ NORT.

El test de reconocimiento de objetos también se llevó a cabo en ambas edades. En las ratas jóvenes, aunque no se encontraron diferencias significativas los animales de ambos grupos pasaron más tiempos explorando el objeto nuevo que el familiar en valor absoluto. En general, a lo largo de este trabajo se han encontrado dificultades para llevar a cabo la evaluación cognitiva de animales jóvenes con pruebas de comportamiento, de hecho, se ha descrito que los animales jóvenes tienen una menor capacidad para la exploración y mayor falta de atención que los animales adultos. Por el contrario, se observaron diferencias cuando los animales envejecieron (Figura 20.b). En la edad adulta, el tiempo durante el cual las ratas del grupo 2'-FL exploraron el objeto nuevo fue significativamente mayor ( $p=0.003$ ) al que pasaron explorando el familiar; por su parte las ratas del grupo control exploraron ambos objetos durante el mismo tiempo. Otro dato interesante fue que las ratas adultas del grupo 2'-FL tendieron a pasar más tiempo explorando los objetos (familiar y nuevo) que los controles. De esta forma, si comparamos ambos grupos, los animales que fueron suplementados con 2'-FL exploraron el nuevo objeto por más tiempo que los controles ( $p=0.0475$ ). Estos resultados podrían respaldar un efecto positivo a largo plazo de la 2'-FL respecto a la tarea de reconocimiento de objetos.

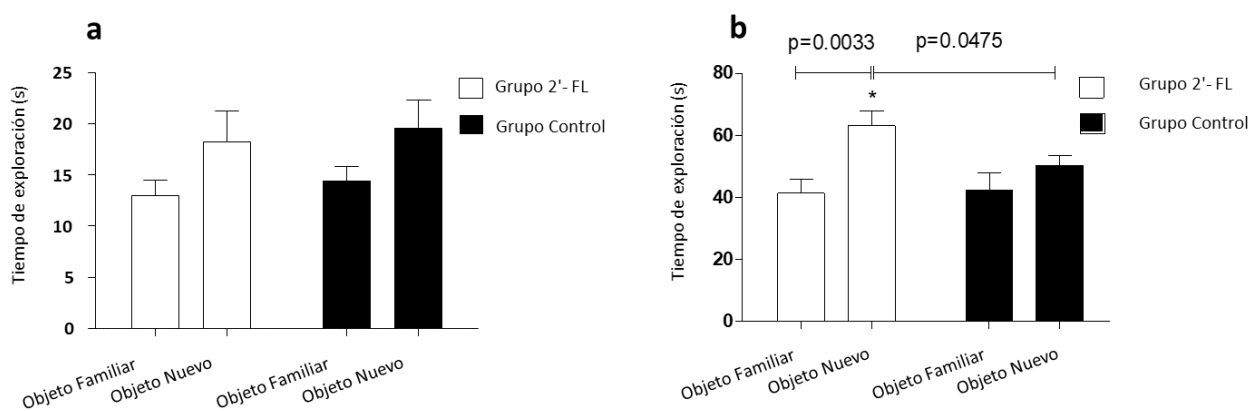


Figura 18. **NORT.** Tiempo de exploración (s) de los objetos familiar y nuevo para los dos grupos de estudio en animales jóvenes ( $n=8$  ratas/grupo) y ratas de 1 año de edad ( $b$ ,  $n=12$  ratas/grupo) en la fase de retención. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. Estudio estadístico realizado con un test t de Student; \* indica diferencias significativas al comparar los tiempos de exploración ( $p<0.05$ ).

## RESULTADOS

### ▪ Laberinto en Y con brazo bloqueado.

De nuevo, esta prueba se realizó tanto en animales jóvenes como adultos para lo cual se adaptaron las dimensiones del laberinto a cada edad. A pesar de ello, esta tarea no se pudo completar en animales jóvenes pues las ratas tendían a saltar del laberinto hacia el exterior imposibilitando el análisis.

En el caso de los animales adultos (Figura 21), éstos completaron la tarea de manera adecuada. Un desempeño correcto de esta prueba consiste en mostrar una mayor tendencia a visitar el brazo nuevo en primer lugar y durante más tiempo en la fase de retención.

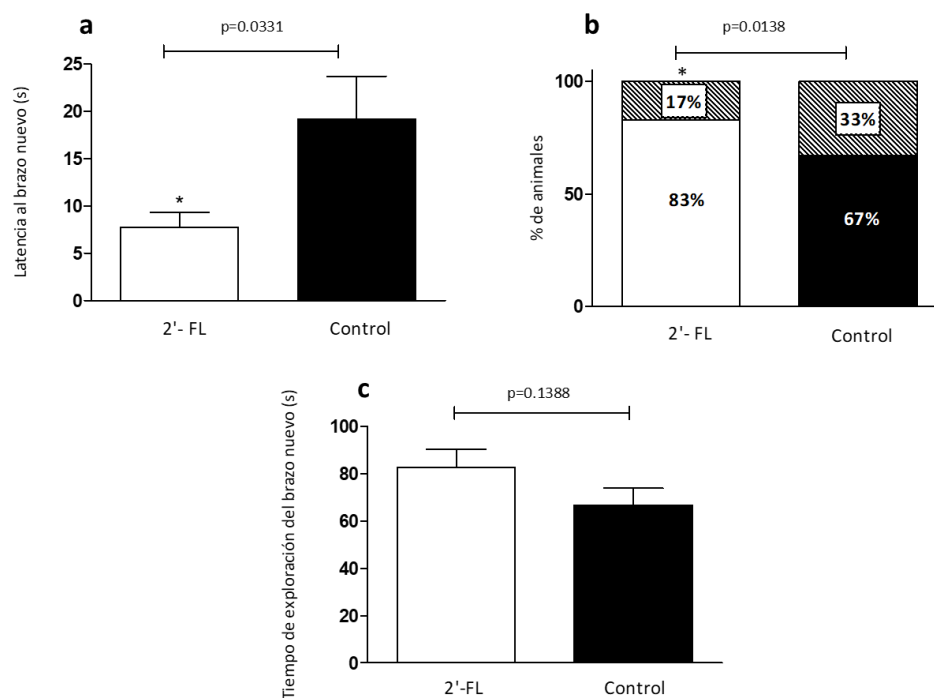


Figura 19. **Laberinto en Y con brazo bloqueado.** (a) Latencia al brazo nuevo en animales de 1 año de edad en la fase de retención. Los resultados se expresan como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Estudio estadístico realizado con un test t de Student. \* indica diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). (b) Porcentaje de ratas de 1 año de edad que eligieron el brazo nuevo como primera opción en la fase de retención (parte de la columna lisa) frente al porcentaje de animales que no lo hicieron (parte de la columna rayada). Estudio estadístico mediante test de Fisher; \* indica diferencias significativas  $p < 0.05$ . (c) Tiempo de exploración del objeto nuevo en la fase de retención en ratas de 1 año. Los resultados se expresan como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Estudio estadístico realizado con una t de Student.

Los datos obtenidos del laberinto Y en animales adultos mostraron que la latencia al brazo nuevo de las ratas del grupo 2'-FL fue significativamente menor que la de las ratas control ( $p=0.0331$ ),

## RESULTADOS

es decir fueron más rápidamente a visitar el brazo nuevo que los brazos familiares. Además, se observó que el 83% de las ratas del grupo 2'-FL visitaron el brazo nuevo como primera opción; este porcentaje fue significativamente mayor ( $p = 0.0138$ ) que el del grupo de control (67%). Los animales que recibieron 2'-FL también parecían pasar más tiempo explorando el brazo nuevo que el grupo control, aunque no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.1388$ ).

- **Laberinto acuático de Morris.**

Los animales necesitan ser entrenados en esta tarea. Durante el entrenamiento, la plataforma permanece en la misma posición con respecto a dos pistas externas y la rata debe aprender a usarlas para localizar la plataforma dentro de la piscina. Dicho entrenamiento finaliza cuando el tiempo en el que encontraban la plataforma permanece constante sin disminuir. Por lo tanto, la fase de entrenamiento reflejará cómo se produce el proceso de aprendizaje en la rata.

Como se muestra en la Figura 22, esta fase tardó 8 días en completarse tanto en ratas jóvenes como mayores. El parámetro registrado durante la fase de entrenamiento fue el tiempo que los animales tardaban en encontrar la plataforma escondida en la piscina. Al transcurrir los días de entrenamiento dicho tiempo debería ir disminuyendo hasta alcanzar un plato en el que ya no baja más. En este punto se realizará la prueba. Cuanto mayor sea la pendiente en la curva de entrenamiento, mejor será el proceso de aprendizaje pues indicaría que el animal acude cada vez más rápidamente hacia la plataforma y, por tanto, que recuerda dónde se encuentra la plataforma en la piscina nadando directamente hacia ella. Tanto en animales jóvenes como en animales adultos, ambos grupos mostraron similares habilidades para aprender dónde estaba la plataforma en la fase de entrenamiento.

## RESULTADOS

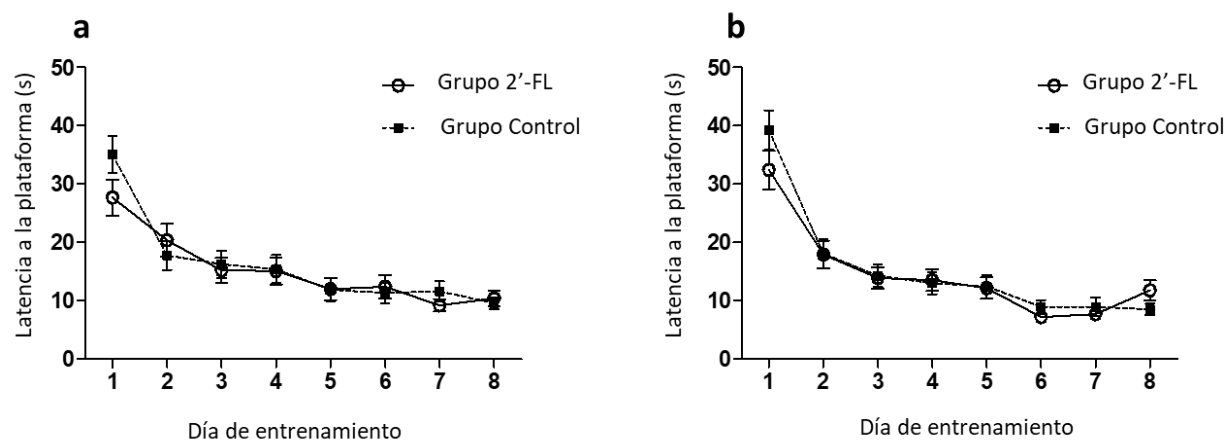


Figura 20. **Laberinto acuático de Morris**. Latencia a la plataforma en las sesiones de entrenamiento para animales jóvenes (a) y adultos (b).  $n=12$  animales/grupo. Los resultados mostrados son la media para cada día de entrenamiento (4 entrenamientos/rata/día). Estudio estadístico realizado con un ANOVA de dos vías.

En el día de prueba en el caso de los animales jóvenes, no se encontraron diferencias entre los grupos con respecto a la latencia a la plataforma ( $12.6 \pm 3.4s$  para el grupo 2'-FL frente a  $19.2 \pm 4.4s$  para el grupo de control,  $p=0.2463$ ) o el tiempo pasado en el cuadrante objetivo ( $24 \pm 2.3s$  para el grupo 2'-FL versus  $20.2 \pm 1.7s$  para el grupo de control,  $p=0.1874$ ). Un año después, cuando las ratas fueron de nuevo evaluadas en el laberinto de Morris, los resultados obtenidos fueron parecidos a los observados en la juventud: no se observaron diferencias significativas entre los grupos para la latencia a la plataforma ( $10.3 \pm 2s$  para el grupo 2'-FL versus  $6.4 \pm 1.3s$  para el grupo control,  $p=0.1085$ ) o para tiempo transcurrido en el cuadrante objetivo ( $24.1 \pm 2.3s$  para el grupo 2'-FL versus  $29.4 \pm 2s$  para el grupo control,  $p=0.0893$ ). Si se observan los valores absolutos, mientras que las ratas 2'-FL parecían tener un mejor rendimiento que las ratas de control cuando eran jóvenes, se observó lo contrario en animales de edad avanzada. No obstante, las diferencias no alcanzaron significación en ningún grupo de edad.

## 5.2 Experimento 2.

### Evaluación de los efectos de una suplementación oral con 6'-SL en crías de rata durante el período de lactación en el desarrollo cognitivo.

#### 5.2.1 Contenido de ácido siálico en el cerebro.

El contenido de Neu5Ac en cerebro de las ratas al destete (día PN22) y al año de edad se muestra en la Tabla 2. La concentración cerebral de ácido siálico ( $\mu\text{g Neu5Ac/mg}$  de cerebro) no mostró diferencias significativas entre los tres grupos experimentales a ninguna edad.

Tabla 2. Concentración de ácido siálico ( $\mu\text{g Neu5Ac/mg}$  cerebro) en ratas al destete y al año de edad suplementadas con distintas fuentes de ácido siálico o agua durante el periodo de lactación. Resultados expresados como media $\pm$ SEM.

Concentración de Ácido Siálico ( $\mu\text{g Neu5Ac/mg}$ cerebro)				
	Grupo Neu5Ac	Grupo 6'-SL	Grupo Control	Valor P
<b>Crías de rata (n=8/grupo)</b>	1.399 $\pm$ 0.067	1.405 $\pm$ 0.124	1.422 $\pm$ 0.058	p=0.8336
<b>Ratas 1 año edad (n=8-10/grupo)</b>	1.018 $\pm$ 0.106	1.067 $\pm$ 0.025	0.9745 $\pm$ 0.096	p=0.2143

#### 5.2.2 Western Blot.

Se analizaron muestras de corteza frontal de crías destetados (PN22) para determinar la expresión de NCAM y PSA-NCAM mediante Western blot (6 crías/grupo). La  $\beta$  actina se usó como control para la cuantificación. El grupo de control se utilizó como grupo de referencia.

Como se muestra en la Figura 23, no se encontraron diferencias entre los grupos en relación a la expresión de NCAM (p=0.8819). Sin embargo, las ratas que recibieron suplementación de 6'-SL

## RESULTADOS

durante la lactancia expresaron más PSA-NCAM en la corteza frontal en comparación con las ratas suplementadas con Neu5Ac ( $p=0.012$ ) o animales del grupo control ( $p=0.041$ ).

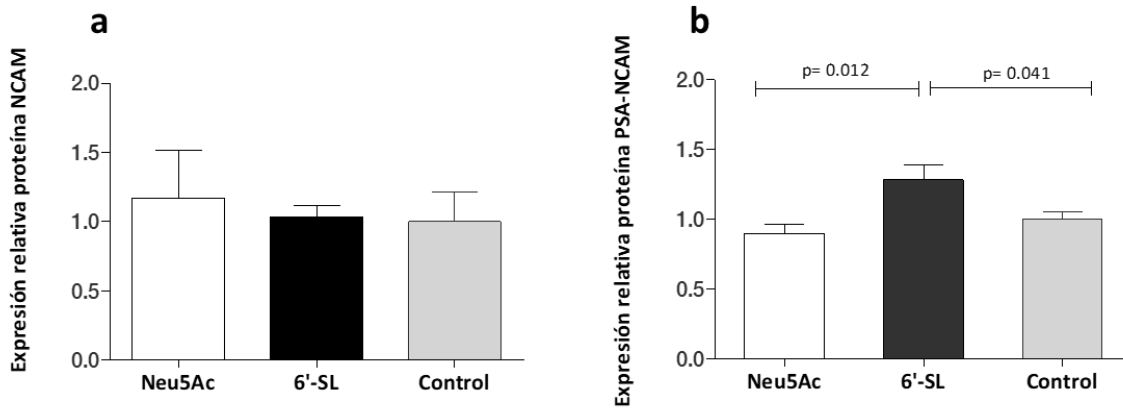


Figura 21. Expresión relativa de las proteínas NCAM (a) y PSA-NCAM (b) en muestras de corteza frontal de animales al destete de los tres grupos experimentales. Resultados expresados como media $\pm$ SEM ( $n=6$  animales/grupo),  $p<0.05$  indica diferencias significativas entre grupos. Estudio estadístico realizado mediante el test t de Student y ANOVA.

### 5.2.3 LTP "In vivo".

Al año de edad, se llevó a cabo la LTP *in vivo* en ratas macho (10 ratas/grupo) cuya representación se puede ver en la FIGURA 24. La respuesta de LTP fue significativamente mayor en ratas suplementadas con 6'-SL durante la lactancia en comparación con los controles. Estas diferencias permanecieron incluso en los días posteriores a la estimulación. El grupo Neu5Ac también alcanzó en valor absoluto una mayor respuesta en LTP que el grupo control, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

## RESULTADOS

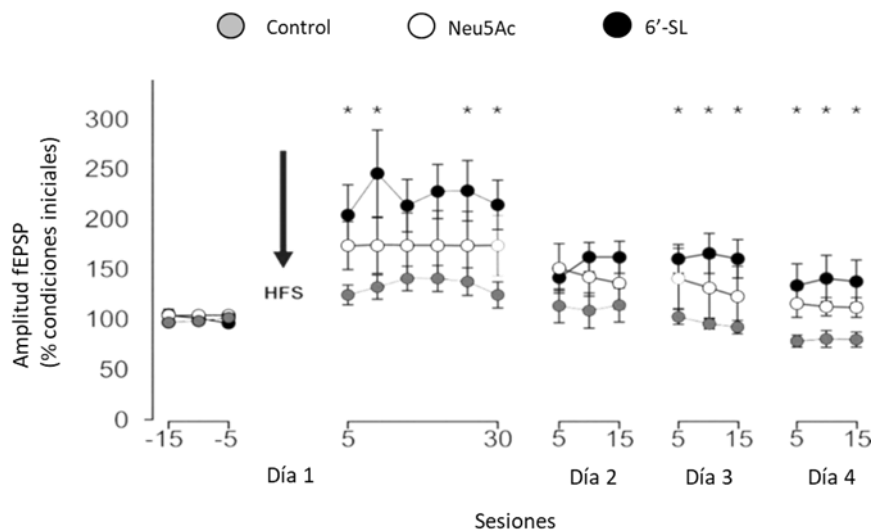


Figura 22. LTP. Potenciales experimentalmente evocados en los tres grupos de animales en estudio al año de edad. Los datos se recogieron antes y después de aplicar el estímulo (HFS) y se representan como media $\pm$ SEM. Estudio estadístico con ANOVA; \* indica diferencias significativas entre el grupo 6'-SL y el grupo control ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.4 Pruebas de comportamiento.

Se realizó una evaluación del comportamiento con diferentes pruebas a diferentes edades. Al destete y al año se llevaron a cabo el NORT y la prueba del laberinto Y con brazo bloqueado. Los resultados obtenidos al destete no mostraron ninguna diferencia entre los tres grupos evaluados (datos no mostrados). Por el contrario, los datos encontrados en la edad adulta fueron más concluyentes y sí se apreciaron diferencias entre grupos.

#### ▪ NORT.

Con respecto al NORT, el parámetro clave que se evaluó fue el tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo frente al familiar en la fase de retención. Los animales con buenas habilidades cognitivas tenderían a explorar el objeto nuevo por más tiempo. Como se muestra en la Figura 25, las ratas que pertenecen a los grupos que recibieron suplementación, tanto Neu5Ac como con 6'-SL, pasaron más tiempo explorando el objeto nuevo que el familiar ( $n=8$  ratas/grupo). En

## RESULTADOS

el caso del grupo control, los animales exploraron durante el mismo tiempo el objeto familiar y el nuevo, lo que sugiere que no los llegaron a diferenciar.

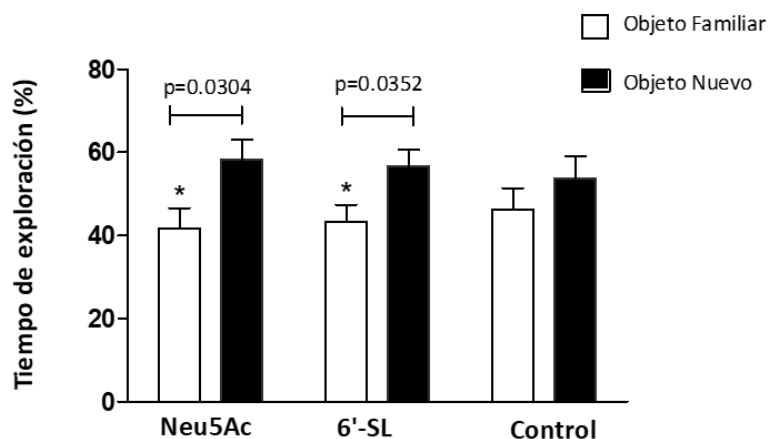


Figura 23. **NORT**. Tiempo de exploración (%) que las ratas de 1 año de edad pasan explorando el objeto nuevo frente al familiar en la fase de retención para los tres grupos de estudio.  $n=8$  ratas/grupo. Estudio estadístico realizado con test  $t$  de Student y ANOVA;  $p<0.05$  indica diferencias significativas entre grupos.

### ▪ Laberinto Y con prueba de brazo bloqueado.

En cuanto a la tarea del laberinto en Y con brazo bloqueado, en las ratas adultas ( $n=8$  ratas/grupo) de nuevo se observó que en la fase de retención los animales que habían recibido ácido siálico, ya sea como Neu5Ac o como 6'-SL durante la lactancia, se comportaron significativamente mejor que el grupo de control al identificar claramente el brazo nuevo, es decir aquel que había sido previamente bloqueado durante la fase de adquisición.

La Figura 26 muestra el porcentaje de animales de cada grupo que visitaron en primer lugar el brazo nuevo frente al porcentaje de animales que visitaron en primer lugar los brazos familiares en la fase de retención. Las ratas que recibieron ácido siálico durante la lactación alcanzaron las mejores puntuaciones: el 88% de los animales suplementados con 6'-SL y el 75% de las ratas que recibieron Neu5Ac visitaron primero el brazo nuevo. Por el contrario, el grupo de control visitó el brazo nuevo en primer lugar en el mismo porcentaje que los familiares. Desde un punto de vista estadístico, la puntuación alcanzada por el grupo 6'-SL fue significativamente mayor, no solo en comparación con el grupo control ( $p<0,0001$ ) sino también en comparación con el grupo



## RESULTADOS

Neu5Ac ( $p=0.0279$ ); también se observó un mejor resultado de los animales que recibieron Neu5Ac frente a los controles ( $p=0.0004$ ).

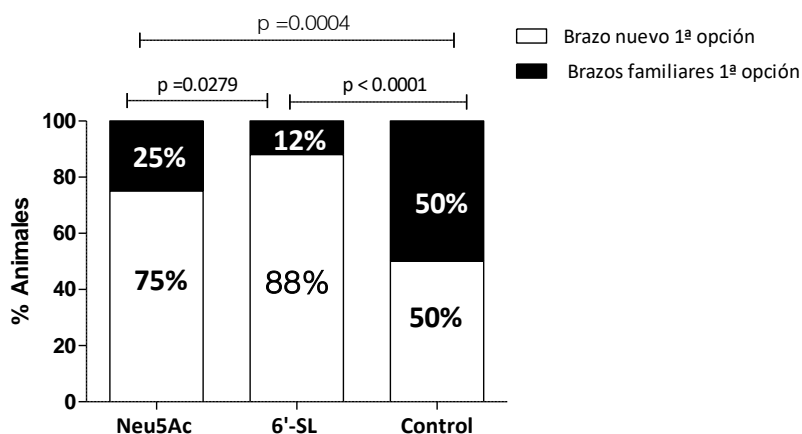


Figura 24. **Laberinto en Y con brazo bloqueado.** Porcentaje de ratas de 1 año de edad que eligieron el brazo nuevo como primera opción de visita en la fase de retención frente a aquellos que no lo hicieron.  $n=8$  ratas/grupo. Estudio estadístico mediante test de Fisher. \*  $p < 0.05$  indica diferencias significativas entre grupos.

### ▪ Protocolo IntelliCage®.

En cuanto a la prueba realizada con el sistema IntelliCage® ( $n=8$  ratas/grupo), los resultados obtenidos fueron similares a los observados en las pruebas de comportamiento anteriores.

Como se explicó en la sección 4.2.7, durante la prueba, que se realizó en dos días consecutivos, el acceso al agua se restringió a dos sesiones por día en las esquinas correctas (asignadas para cada rata). Se analizaron los porcentajes de visitas a las esquinas correctas e incorrectas. Los grupos suplementados con Neu5Ac y 6'-SL obtuvieron el 41% y el 39% de visitas correctas, respectivamente, mientras que el grupo control alcanzó el 25% de las visitas correctas (Figura 27). De este modo, de nuevo los grupos suplementados con ácido siálico, con Neu5Ac o 6'-SL, mostraron un mejor comportamiento en la tarea en comparación con el grupo de control.

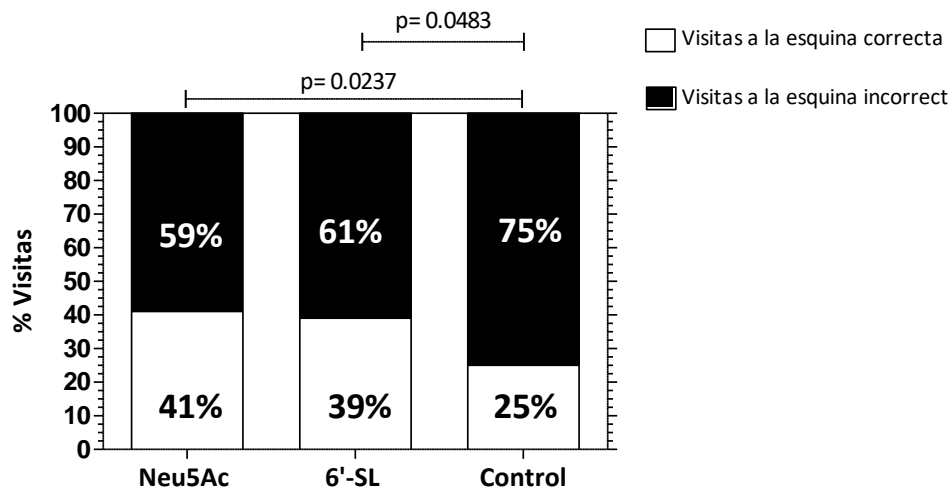


Figura 25. *Intelligence*®. Porcentaje de visitas a la esquina correcta frente a la incorrecta en ratas de 1 año de edad de los tres grupos experimentales durante los días de prueba (2 días, 2 sesiones/día). n=8 ratas/grupo. Estudio estadístico mediante test de Fisher;  $p < 0.05$  indica diferencias significativas entre grupos.

### 5.3 Estudio clínico materno-infantil.

**Evaluación del efecto del estado metabólico materno sobre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL en la leche humana y su potencial influencia en el neurodesarrollo de los niños.**

**Estudio clínico PREOBE.**

#### 5.3.1 Datos demográficos, de base o referencia.

La información demográfica, las condiciones de referencia y otras características generales de la población de estudio se muestran en la Tabla 3.

Se comprueba una ganancia de peso durante la gestación significativamente menor en las madres que desarrollaron diabetes gestacional respecto al resto de grupos. El coeficiente intelectual paterno resultó significativamente más bajo en los padres de los niños nacidos de madres obesas; el nivel educativo de las madres sanas normopeso era significativamente más alto que el de las madres obesas.

## RESULTADOS

Tabla 3. Características generales e información adicional de las parejas de “madre-hijo” que participaron en el presente estudio y comparación entre los grupos de estudio.

		Peso Normal n=32	Sobrepeso n=23	Obesidad n=13	DMG n=14	Valor-P
<b>VARIABLES MATERNAS/PATERNAS</b>						
Edad Materna (Años)*		31.47±3.84	32.39±3.76	31.69±4.09	33.36±3.03	0.429
Peso Pre-concepcional (Kg)*		58.78±5.16 <sup>a</sup>	72.83±5.95 <sup>b</sup>	85.13±8.73 <sup>b</sup>	75.05±26.6 <sup>b</sup>	<0.001
IMC Pre-concepcional (Kg/m <sup>2</sup> )*		21.98±1.53 <sup>a</sup>	27.46±1.39 <sup>ab</sup>	33.64±2.86 <sup>b</sup>	28.42±9.19 <sup>ab</sup>	<0.001
Ganancia peso embarazo (Kg)*		12.59±3.48 <sup>a</sup>	11.52±5.65 <sup>a</sup>	9.28±5.51 <sup>a</sup>	5.7±11.35 <sup>b</sup>	0.013
Tabaco	No	26	22	13	14	0.062
	Sí	6	1	0	0	
Alcohol	No	32	22	12	13	0.507
	Sí	0	1	1	1	
Peso placenta (g)*		498.71±134.18	504.00±122.71	536.15±136.23	465.38±90.06	0.556
Tipo de parto	Eutócico	21	13	8	7	0.521
	Distócico	5	3	1	3	
	Cesárea	6	7	4	4	
CI Materno (puntos)*		112.92±11.99	103.50±15.37	111.27±13.18	106.17±13.35	0.123
CI Paterno (puntos)*		109.08±11.2 <sup>ab</sup>	102.78±11.21 <sup>ab</sup>	92.67±6.35 <sup>a</sup>	111.89±6.25 <sup>b</sup>	0.025
Nivel educativo materno	Primaria/ Secundaria	11 <sup>a</sup>	13 <sup>ab</sup>	12 <sup>b</sup>	8 <sup>ab</sup>	0.005
	Universidad	21 <sup>a</sup>	10 <sup>ab</sup>	1 <sup>b</sup>	6 <sup>ab</sup>	
Estado familiar	Soltera/ Separada	0	0	1	0	N/A
	Casada/ En pareja	32	23	12	14	
<b>VARIABLES DEL LACTANTE</b>						
EG (semanas)*		39.5±1.14	39.64±1.18	40.31±1.11	39.23±1.42	0.119
Peso al nacer (Kg)*		3.33±0.39	3.31±0.49	3.49±0.42	3.24±0.41	0.481
Longitud al nacer (cm)*		50.47±1.77	50.20±2.00	51.35±1.89	50.58±2.11	0.383
Ø cabeza (cm)*		34.13±1.28	34.36±1.34	35.04±1.16	34.88±0.92	0.106
Ø cintura (cm)*		32.19±2.14 <sup>a</sup>	32.24±2.35 <sup>a</sup>	34.55±2.24 <sup>b</sup>	33.41±2.01 <sup>ab</sup>	0.029
Sexo	Niño	14	10	7	8	0.786
	Niña	18	13	6	6	
Tipo alimentación 1er mes	LM	30	21	10	13	0.733
	F	0	0	0	0	
	Mixta	2	2	2	1	
Tipo alimentación 3er mes	LM	19	14	7	7	0.901
	F	5	4	4	4	
	Mixta	8	5	2	3	
Tipo alimentación 6º mes	LM	6	6	2	4	0.724
	F	12	11	4	6	
	Mixta	13	6	7	4	

DMG: Diabetes Mellitus Gestacional. n=número de casos. IMC: Índice de masa corporal; EG: Edad gestacional; Ø: Perímetro; \*Resultados expresados como media ± desviación estándar; resto de resultados expresados como frecuencias. Estudio estadístico con ANOVA para variables normales, test de Kruskal-Wallis para variables no normales continuas y prueba de Chi-cuadrado para proporciones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos p<0.05.

## RESULTADOS

Respecto a las variables antropométricas al nacimiento, el perímetro de la cintura resultó significativamente más grande en los recién nacidos de madres obesas respecto al de los bebés de madres con sobrepeso o peso normal.

### 5.3.2 Concentraciones de HMOs en la leche materna.

#### ▪ Concentración de 6'-SL.

Se analizó el contenido de 6'-SL en muestras de leche humana al mes postparto. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y se representan en la Figura 28. No se encontraron diferencias significativas ( $p=0.641$ ) al comparar los grupos de estudio.

Tabla 4. Concentración de 6'-SL en leche materna madura (1<sup>er</sup> mes postparto) de madres pertenecientes al estudio PREOBE.

GRUPO	n	6'-SL					Valor P
		Media	SD	Median	Min	Max	
Peso Normal	32	394.10	156.02	393.12	133.56	782.21	0.641
Sobrepeso	23	381.54	213.08	317.94	93.74	1096.37	
Obesidad	13	457.85	220.32	507.36	164.64	930.89	
DMG	14	397.34	215.11	393.58	97.86	955.25	

DMG: Diabetes mellitus gestacional; n: número de muestras; DS: desviación estándar; Min: valor mínimo; Max: Valor máximo. Test de Kruskal-Wallis (non-paramétrico)

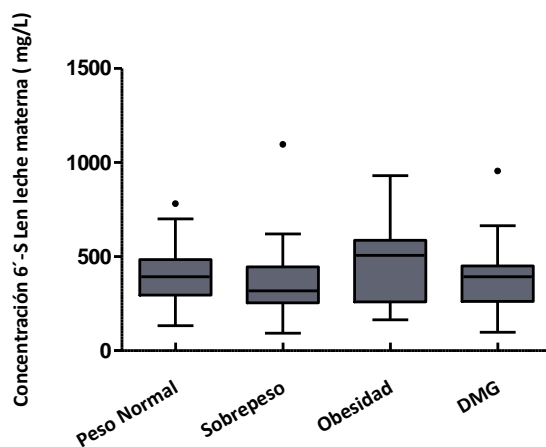


Figura 26. Diagrama de caja y bigote para las concentraciones de 6'-SL en leche materna madura (1<sup>er</sup> mes postparto) de madres participantes en el estudio PREOBE. Las líneas horizontales en las cajas representan las medianas. Los valores atípicos (outliers) se representan como puntos individuales y se detectaron aplicando la regla de Tukey.

## RESULTADOS

### ▪ Concentración de 2'-FL.

Para entender correctamente los resultados expuestos a continuación conviene recordar que en general, no todas las madres contienen 2'-FL en la leche de forma que su presencia en la leche humana depende del sistema del grupo histo-sanguíneo al que pertenezca la madre: las madres no secretoras generalmente carecen de 2'-FL y otros oligosacáridos  $\alpha$ 1-2 fucosilados debido a la ausencia de la enzima FUT2 [42]. En algunos estudios, el estado secretor o no secretor se determina mediante pruebas serológicas, como se menciona en una revisión sistemática publicada recientemente [185]; sin embargo, estas pruebas no se incluyeron en el protocolo del presente ensayo clínico. Como en este caso se pudo detectar 2'-FL en todas las muestras de leche, se prefirió hacer referencia a las madres con concentraciones bajas o altas de 2'-FL en su leche en lugar de madres no secretoras y secretoras. Las concentraciones de 2'-FL para las 82 madres fueron representadas gráficamente (Ver Figura 29). El gráfico mostró una clara distribución de las madres estudiadas en dos subgrupos diferentes en función de si la concentración de 2'-FL fuera baja o alta. De un total de 82 madres, 35 se incluyeron en el subgrupo de baja concentración de 2'-FL y las 47 restantes, en el grupo de alta concentración de 2'-FL, representando aproximadamente el 43% y el 57% del total de madres, respectivamente.

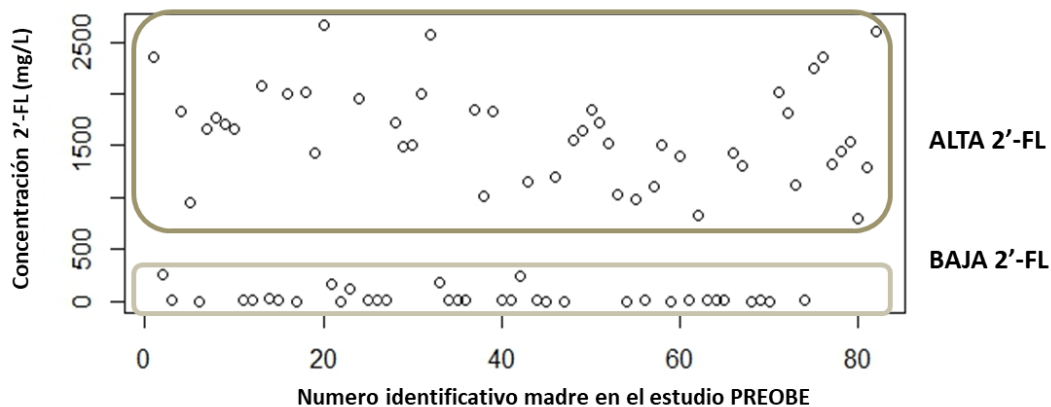


Figura 27. Distribución de las madres estudiadas según la presencia de concentraciones altas o bajas de 2'-FL en la leche materna.

La Tabla 5 y la Figura 30 muestran los resultados obtenidos respecto al contenido de 2'-FL en las muestras de leche humana madura. No se encontraron diferencias significativas al comparar las concentraciones de 2'-FL de los grupos de estudio generales (normopeso, sobrepeso, obesidad o

## RESULTADOS

DMG) teniendo en cuenta los subgrupos con baja 2'-FL ( $p=0.092$ ) o alta 2'-FL ( $p=0.215$ ). En el subgrupo con baja concentración de 2'-FL en leche materna, las medias oscilaron entre 3.89 y 10.2 mg/L en las madres con DMG y en las madres normopeso, respectivamente; en el caso de las madres con alta concentración de 2'-FL en la leche, los valores medios también oscilaron entre 1153.03 mg/L y 1712.80 mg/L para madres con DMG y las normopeso, respectivamente. En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 5. Concentración de 2'-FL en leche madura según los grupos de madres establecidos en el estudio PREOBE.

GRUPO	ALTA 2'-FL						Valor P	BAJA 2'-FL						Valor P
	n	Media	SD	Mediana	Min	Max		n	Media	SD	Mediana	Min	Max	
Peso Normal	10	51.19	71.60	10.20	2.99	173.49	0.092	22	1754.36	381.88	1712.80	945.65	2597.28	0.215
Sobrepeso	13	23.70	71.57	4.35	1.34	261.83		10	1560.17	507.46	1491.44	794.93	2352.63	
Obesidad	5	10.37	12.19	4.61	2.71	31.73		8	1641.45	519.25	1492.55	1025.01	2662.59	
DMG	7	39.12	92.79	3.89	0.65	249.47		7	1366.73	548.26	1153.03	827.48	2357.25	

DMG: Diabetes mellitus gestacional; n: número de muestras; DS: desviación estándar; Min: valor mínimo; Max: Valor máximo. Test de Kruskal-Wallis (non-paramétrico)

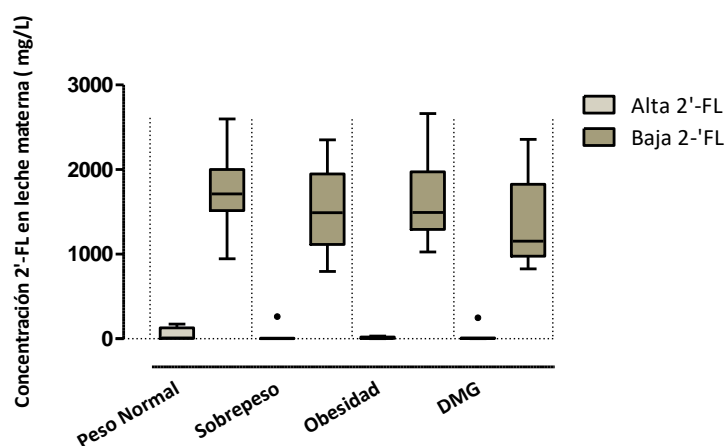


Figura 28. Diagrama de caja y bigote para las concentraciones de 2'-FL en leche madura (1<sup>er</sup> mes postparto) de madres participantes en el estudio PREOBE. Las líneas horizontales en las cajas representan las medianas. Los valores atípicos (outliers) se representan como puntos individuales y se detectaron aplicando la regla de Tukey.

## RESULTADOS

### 5.3.3 Evaluación del neurodesarrollo hasta los 18 meses.

De las 82 madres que proporcionaron muestras de leche, 81 dieron su consentimiento para evaluar a sus bebés a los 6 meses de edad usando el test BSDI-III y 76 madres lo hicieron para la evaluación de sus hijos a los 18 meses.

Como se observó en la sección anterior, ni el IMC pregestacional ni el desarrollo de diabetes gestacional en la madre influyeron en las concentraciones de 2'-FL o 6'-SL en la leche madura. Considerando este hecho, se creyó conveniente agrupar todos los resultados obtenidos del análisis de las 82 muestras de leche materna, para el análisis de la posible asociación entre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL en la leche humana y las puntuaciones de los dominios de neurodesarrollo obtenidos en los bebés a los 6 y 18 meses de edad mediante el test BSID-III.

Se hizo un primer análisis de correlación de Pearson para detectar las posibles asociaciones entre las concentraciones de 6'-SL y 2'-FL en leche materna y las puntuaciones obtenidas en las diferentes escalas del test BSDI-III. Los resultados obtenidos mostraron una asociación positiva entre la concentración de 6'-SL y las puntuaciones obtenidas por los bebés en la escala cognitiva a los 18 meses de edad; por otra parte, los resultados también mostraron una débil asociación positiva entre las concentraciones de 2'-FL y las puntuaciones obtenidas por los lactantes en la escala motora a los 6 meses de edad (Figura 31). Sin embargo, en el caso de la 2'-FL dicha correlación positiva se perdió al separar los sujetos en los grupos de Alta 2'-FL y Baja 2'-FL, probablemente debido al bajo número de casos en cada grupo y/o a la influencia de aquellos cuyas madres presentaron baja concentración de 2'-FL en la leche.

## RESULTADOS

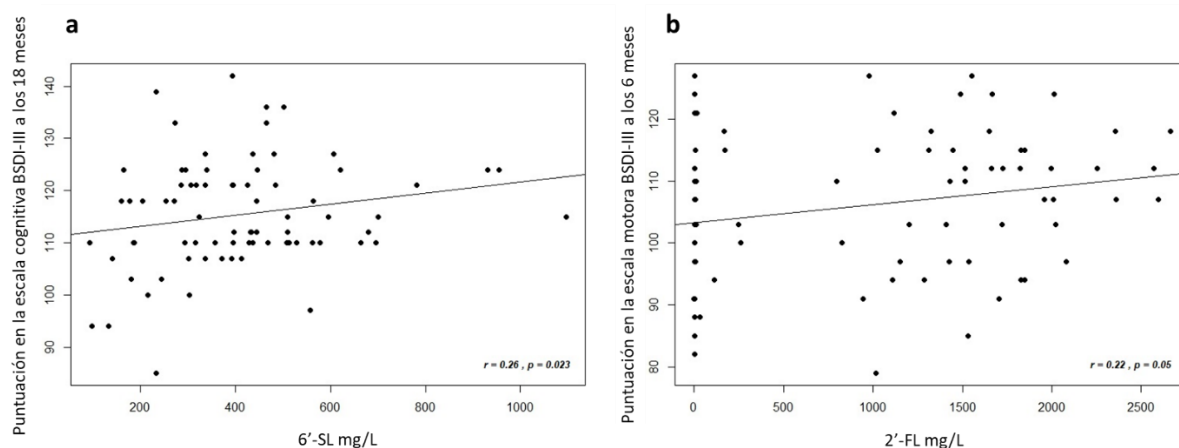


Figura 29. Correlaciones de Pearson entre las concentraciones de 6'-SL en leche materna y los resultados obtenidos por los bebés en la escala cognitiva a los 18 meses (a) y las concentraciones de 2'-FL en leche materna y los resultados obtenidos por los bebés en la escala motora a los 6 meses de edad (b).

A continuación, dados los resultados obtenidos se decidió llevar a cabo un análisis de regresión multivariante no ajustado y ajustado como se muestra en las Tablas 6 y 7. El ajuste estadístico se realizó en base a dos enfoques diferentes: (1) utilizando como factores de confusión la ganancia de peso en el embarazo, el coeficiente intelectual paterno y el nivel educativo materno ya que esos factores son significativamente diferentes entre los grupos de estudio PREOBE (Ver Tabla 3); (2) utilizando como factores de confusión aquellas variables significativamente diferentes al analizar las condiciones de referencia para los grupos de alta 2'-FL y baja 2'-FL; en este último caso, los grupos sólo eran diferentes en cuanto al peso materno pre-concepcional ( $p=0.032$ ).

Respecto a la 6'-SL, en la regresión multivariante no ajustada se observó una asociación positiva ( $p=0.023$ ) entre las concentraciones de la 6'-SL en leche materna y las puntuaciones alcanzadas en las escalas cognitivas por los bebés a los 18 meses de edad (Ver también el gráfico de correlación en la Figura 31.a) y se identificó una tendencia ( $p=0.082$ ) entre las concentraciones de la 6'-SL y los resultados en la escala motora a la misma edad (Tabla 6). Cuando se llevó a cabo el ajuste por la ganancia de peso en el embarazo, el coeficiente intelectual paterno, el nivel educativo materno y el grupo de estudio PREOBE, se mantuvo la asociación positiva entre la concentración de la 6'-SL y las puntuaciones cognitivas a los 18 meses de edad ( $p=0.041$ ). Para el segundo enfoque estadístico en el que el peso materno pre-concepcional y los grupos de estudio



## RESULTADOS

PREOBE se tomaron como factores de confusión, se comprobó una asociación positiva entre las concentraciones de la 6'-SL y las puntuaciones cognitivas a los 18 meses de edad ( $p=0.019$ ), así como para las concentraciones de la 6'-SL y las puntuaciones motoras a la misma edad ( $p=0.043$ ) (Tabla 6).

En cuanto a la 2'-FL (Tabla 7), en la regresión multivariante no ajustada se observó una tendencia ( $p=0.0502$ ) para una asociación positiva entre las concentraciones de 2'-FL en leche materna y las puntuaciones motoras a los 6 meses de edad que alcanzó significación ( $p=0.041$ ) cuando se ajustó para el peso preconcepcional materno y los grupos del estudio PREOBE. El análisis de regresión multivariante similar, considerando los niveles de 2'-FL para los grupos Alta 2'-FL y Baja 2'-FL en leche materna no pudo realizarse por separado debido al bajo número de casos que quedaban en cada grupo.

Tabla 6. Regresión multivariante entre las concentraciones de 6'-SL en leche materna y los resultados obtenidos en las distintas escalas del test BSDI-III en los niños a los 6 y 18 meses de edad.

	Concentración 6'-SL					
	Sin ajuste		Ajustada**		Ajustada***	
	Coefficiente $\beta$	Valor-P	Coefficiente $\beta$	Valor-P	Coefficiente $\beta$	Valor-P
<b>Puntuación en BSDI-III a los 6 meses de edad</b>						
Escala cognitiva	0.007	0.831	0.006	0.741	-0.001	0.954
Escala de lenguaje	-0.007	0.241	-0.007	0.914	-0.007	0.214
Escala Motora	0.001	0.791	-0.005	0.551	-0.002	0.851
Escala socio-emocional	-0.003	0.321	0.120	0.251	-0.004	0.214
<b>Puntuación en BSDI-III a los 18 meses de edad</b>						
Escala cognitiva	0.012	0.023*	0.051	0.041*	0.016	0.019*
Escala de lenguaje	0.001	0.521	0.002	0.751	0.004	0.417
Escala motora	0.012	0.082 <sup>†</sup>	-0.011	0.124	0.019	0.043*
Escala socio-emocional	-0.110	0.177	-0.080	0.145	-0.011	0.201
*: Indica diferencias significativas; †: indica una tendencia. **: Modelo ajustado considerando como factores de confusión: Ganancia de peso en el embarazo + IC Paterno + Nivel cultural materno + Grupo de estudio PREOBE. ***: Modelo ajustado considerando como factores de confusión: Peso materno pre-concepcional + Grupo de estudio PREOBE.						

## RESULTADOS

Tabla 7. Regresión multivariante entre las concentraciones de 2'-FL en leche materna y los resultados obtenidos en las distintas escalas del test BSDI-III en niños a los 6 y 18 meses de edad.

	Concentración 2'-FL					
	Sin Ajuste		Ajustada**		Ajustada***	
	Coeficiente $\beta$	Valor-P	Coeficiente $\beta$	Valor-P	Coeficiente $\beta$	Valor-P
<b>Puntuación en BSDI-III a los 6 meses de edad</b>						
Escala cognitiva	0.004	0.667	0.004	0.551	0.004	0.421
Escala de lenguaje	0.006	0.592	0.005	0.214	0.001	0.285
Escala motora	0.002	0.0502 <sup>†</sup>	-0.002	0.732	0.003	0.041 <sup>*</sup>
Escala socio- emocional	0.003	0.852	-0.001	0.124	-0.004	0.974
<b>Puntuación en BSDI-III a los 18 meses de edad</b>						
Escala cognitiva	0.002	0.521	0.002	0.321	0.002	0.551
Escala de lenguaje	0.002	0.839	0.001	0.558	-0.001	0.821
Escala motora	-0.001	0.721	0.001	0.421	0.002	0.695
Escala socio-emocional	0.007	0.686	0.002	0.686	0.002	0.688
*: Indica diferencias significativas; †: indica una tendencia.						
**: Modelo ajustado considerando como factores de confusión: Ganancia de peso en el embarazo + IC Paterno + Nivel cultural materno + Grupo de estudio PREOBE.						
***: Modelo ajustado considerando como factores de confusión: Peso materno pre-concepcional + Grupo de estudio PREOBE.						



## *6. DISCUSIÓN*



### 6.1 Experimento 1.

#### Evaluación de los efectos de una suplementación oral con 2'-FL en crías de rata durante el período de lactación en el desarrollo cognitivo.

En este estudio preclínico en ratas se evaluó el efecto de una suplementación oral con 2'-FL durante la lactancia en las habilidades cognitivas a corto y largo plazo. Se evaluaron las funciones cognitivas mediante pruebas de comportamiento y medidas electrofisiológicas tanto en el destete como en la edad adulta. Si bien los efectos sobre el comportamiento de los animales más jóvenes no fueron concluyentes, los animales adultos mostraron claramente los beneficios de una exposición temprana a la 2'-FL sobre las funciones cognitivas.

El papel de la 2'-FL en los procesos de memoria y aprendizaje ha sido previamente abordado por otros grupos de investigación. En un estudio pionero *ex vivo* se demostró una mejora en la LTP al utilizar fucosa y 2'-FL sobre cortes de hipocampo de rata [156]. También se observó un efecto similar de estos compuestos al ser administrados por inyección intrahipocámpica en ratas vivas [157]. Otro estudio más reciente en roedores demostraba que una suplementación oral con 2'-FL mejoraba la capacidad de aprendizaje y la plasticidad sináptica [158]; este estudio se realizó en roedores adultos que recibieron una dieta suplementada con 2'-FL a lo largo de varias semanas. Sin embargo, este diseño no imitaba la exposición real en humanos, que solo están expuestos a la 2'-FL durante el período de lactancia. Dado que la leche de vaca contiene 2'-FL en pequeñas cantidades [186], los bebés alimentados con fórmulas infantiles apenas estarían expuestos a ella y aunque en los últimos años han salido al mercado algunas fórmulas adicionadas de 2'-FL, sólo los bebés amamantados estarían recibiendo este oligosacárido en un nivel significativo. Sin embargo, no todos los humanos pueden sintetizar 2'-FL y, por lo tanto, un porcentaje de bebés amamantados, principalmente en el sur de Asia, tampoco lo recibirían [42].

De esta forma, en el experimento 1 se probó el efecto sobre la función cognitiva de la 2'-FL administrada por vía oral durante la lactancia, tanto al destete como en animales adultos. Se seleccionó una batería de pruebas de comportamiento para medir la función cognitiva como el

## *DISCUSIÓN*

NORT, laberinto en Y con brazo bloqueado y laberinto acuático de Morris. El laberinto en Y y el laberinto acuático de Morris miden el aprendizaje espacial en el que está implicado el hipocampo [187], mientras que el NORT evalúa la memoria de reconocimiento [172] en la que la corteza perirrina desempeña un papel importante [188]. Además, se realizó un método electrofisiológico para evaluar la LTP del hipocampo [171].

Todas estas pruebas se han utilizado en el pasado para evaluar los efectos de la nutrición en la cognición. Por ejemplo, el efecto de los ácidos grasos omega 3 y del ácido siálico sobre el estado cognitivo de los animales han sido probados mediante pruebas de comportamiento clásicas como las utilizadas en este experimento [189,190]. Por su parte la LTP en el hipocampo también se ha usado para evaluar la ingesta de antioxidantes como una forma de revertir el deterioro cognitivo causado por una dieta alta en grasas [191].

Una limitación de este experimento es la dificultad para realizar pruebas cognitivas en las primeras etapas de la vida. Parece ser que los animales jóvenes podrían desempeñar mejor aquellas tareas que son recompensadas en las que se verían involucradas otras estructuras cerebrales como la amígdala. Además, Leussis y Bolívar [192] señalaron que los roedores antes y durante el destete se habitúan más lentamente a los entornos nuevos y muestran una menor actividad exploratoria en comparación con los animales más viejos. De hecho, en nuestro experimento, este hecho se confirmó puesto que el tiempo de exploración total en el NORT fue menor en los animales jóvenes que en los adultos. Según nuestra experiencia, la actividad física intensa y la falta de concentración de los roedores muy jóvenes son factores a tener en cuenta al realizar evaluaciones cognitivas a esa edad. De hecho, todos los intentos de realizar la prueba del laberinto en Y fallaron porque los animales saltaron del laberinto. Todos los animales se comportaron de manera similar y no se observaron diferencias entre grupos.

El resultado más interesante se encontró cuando los animales envejecieron. Después del destete, las ratas se mantuvieron con una dieta estándar para roedores sin ninguna exposición adicional a la 2'-FL. Muchos estudios afirman que el envejecimiento animal está asociado con peores resultados en tareas como el reconocimiento de objetos que estaría relacionado con un deterioro de la corteza perirrina [193]. En nuestro experimento, las ratas adultas del grupo control no

## *DISCUSIÓN*

fueron capaces de distinguir entre el objeto nuevo y familiar. Por el contrario, los animales que recibieron la 2'-FL diferenciaron claramente entre ambos objetos y mostraron una preferencia por explorar el nuevo. Teniendo esto en cuenta, se podría especular que la exposición temprana a la 2'-FL evitaría, en cierta forma, el declive cognitivo asociado a la edad, pero esta hipótesis debe ser confirmada por otros estudios.

La memoria espacial, medida a través la tarea del laberinto en Y, también parece verse afectada. Un mayor porcentaje de los animales que recibieron 2'-FL seleccionaron el brazo desbloqueado como la primera opción a visitar durante la fase de retención y fueron a visitarlo más rápidamente que los animales control. Estos resultados indican que estos animales pudieron recordar qué brazo estaba previamente bloqueado. Por el contrario, en el laberinto acuático de Morris no se observó mostró ninguna diferencia estadística entre grupos ni al destete ni en la edad adulta. Dado que las pruebas de comportamiento no detectaron diferencias entre las ratas suplementadas con 2'-FL y las ratas control después del destete, se decidió destinar otro grupo de ratas al destete a medidas electrofisiológicas, concretamente la LTP, para poder confirmar si la 2'-FL podría tener efectos cognitivos en animales jóvenes.

La LTP consiste en un aumento persistente en la fuerza sináptica después de un estímulo (HFS). Parece ser que los recuerdos están codificados por modificaciones en la fuerza de las sinapsis, por lo que la LTP es considerada como uno de los principales mecanismos responsables de los procesos de memoria y aprendizaje. Varias áreas del cerebro intervienen en los procesos de formación de la memoria, aunque el hipocampo juega un papel fundamental en la adquisición y almacenamiento de recuerdos, principalmente aquellos relacionados con el aprendizaje espacial. Por ello la LTP en el hipocampo ha sido utilizada por muchos autores para demostrar efectos a nivel cognitivo.

Las pruebas de comportamiento no detectaron diferencias entre los grupos de estudio en animales jóvenes, pero sí se observó un efecto positivo de la suplementación con 2'-FL en la LTP realizada en animales a esa edad. Por ello, la LTP debe considerarse una técnica más adecuada para evidenciar el efecto beneficioso de los compuestos nutricionales a nivel cognitivo en edades tempranas. Además, los resultados en LTP observados en animales jóvenes estaban en



## DISCUSIÓN

consonancia con lo que se observó posteriormente en animales adultos. Algunos estudios han apuntado a la obtención de peores resultados en las medidas de LTP debido al deterioro provocado por el envejecimiento [194]. Por lo tanto, en vista de los resultados obtenidos, la administración de 2'-FL en las primeras etapas de la vida podría contrarrestar parcialmente esta reducción de la LTP en ratas adultas, retrasando el deterioro de la memoria y los procesos de aprendizaje relacionados con la edad.

A pesar de que los resultados obtenidos en el laberinto acuático de Morris no mostraron diferencias entre los grupos de estudio, las otras dos pruebas de comportamiento, laberinto en Y con brazo bloqueado y NORT y el análisis electrofisiológico (LTP) indicaron claramente que la 2'-FL parece tener un efecto beneficioso a largo plazo sobre las habilidades cognitivas en animales, mejorando el rendimiento de los animales adultos que tuvieron una exposición temprana a la 2'-FL en comparación con aquellos que nunca la tuvieron.

Como se comentó anteriormente, estudios previos *in vitro* [156] e *in vivo* [157] demostraron los efectos de una administración directa de la 2'-FL sobre el cerebro (no oral). Vázquez et al. fueron los primeros en demostrar el efecto de una dieta suplementada con 2'-FL en el aprendizaje y memoria en animales adultos [158]. Pues bien, el experimento 1 no solo refuerza estos hallazgos previos, sino que también muestra la eficacia de la suplementación con 2'-FL durante la lactación en el desarrollo cerebral y la persistencia de este efecto más allá del período de suplementación.

### 6.2 Experimento 2.

#### Evaluación de los efectos de una suplementación oral con 6'-SL en crías de rata durante el período de lactación en el desarrollo cognitivo.

En el experimento 2 se analizó el efecto de la administración de dos posibles formas de Neu5Ac, libre o conjugado, durante la lactación en crías de rata sobre las habilidades cognitivas a corto y largo plazo. Las funciones cognitivas se evaluaron mediante mediciones conductuales y electrofisiológicas, y demostraron que estas fuentes de ácido siálico recibida en la primera etapa de la vida tras el nacimiento, tendrían un efecto sobre el mantenimiento de la función cognitiva en la edad adulta y que el uso de una forma conjugada como la 6'-SL puede conferir algunas ventajas respecto al uso del Neu5Ac libre.

En los años 1980 se realizaron los primeros estudios mostrando una relación entre la administración de compuestos sialilados y la composición cerebral. En uno de ellos se demostró que el ácido siálico exógeno se incorporaba a los gangliósidos y glicoproteínas cerebrales cuando era inyectado por vía intraperitoneal en crías de rata [148]. Wang et al. investigaron el destino metabólico del ácido siálico libre marcado con  $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$ -Neu5Ac) administrado por vía intravenosa en lechones, concluyendo que esta fuente exógena de ácido siálico podría atravesar la barrera hematoencefálica e incorporarse a varios tejidos [149]. Carlson y House también demostraron que cuando el Neu5Ac se administra por inyección intraperitoneal u oral tiene un efecto significativo sobre la concentración de gangliósidos y glicoproteínas cerebrales [150]. Otro estudio confirmó el efecto del ácido siálico administrado por vía oral en la concentración de los gangliósidos corticales después de alimentar a crías de rata con una dieta enriquecida con diferentes dosis de ácido siálico del día posnatal 17 al 31. La cantidad de ácido siálico en dichos gangliósidos era mayor en los animales que recibieron una dieta suplementada con ácido siálico a través de una fuente de sialoproteína (casein- glicomacropéptido) [151].

Hasta la fecha se han realizado distintos trabajos de investigación para dilucidar el efecto de una suplementación con ácido siálico en la etapa inicial de la vida no sólo en la composición, sino

## DISCUSIÓN

también en las funciones cognitivas. En un estudio de Morgan y Winick [148], se inyectó por vía intraperitoneal Neu5Ac o glucosa (grupo control) a crías de rata y se observó una mejora en el comportamiento del grupo Neu5Ac. Wang et al. utilizaron un modelo en cerdos [152] para evaluar el efecto de un sustituto de leche de cerda suplementado con varias dosis de casein-glicomacropéptido durante 35 días después del destete; la concentración cerebral de Neu5Ac, la expresión de dos genes asociados al aprendizaje y las habilidades de aprendizaje y memoria tuvieron un impacto positivo como consecuencia de dicha suplementación. Sin embargo, otro equipo de investigación ha publicado recientemente que estudios en los que se llevó a cabo una suplementación con sialilactosa del día posnatal 2 al 22 ó 32 en lechones no mostraron un efecto significativo en las habilidades de memoria de los animales [154] aunque sí hubo un aumento del ácido siálico en la corteza prefrontal [153]. En este sentido, el experimento 2 presenta varias novedades con respecto a investigaciones previas: (1) el uso de un novedoso modelo de madres adoptivas que permitió que las crías de ratas fueran amamantadas durante todo el período de lactancia recibiendo leche con una baja cantidad de ácido siálico desde el día PN 3 hasta el final de la lactación. Además, la intervención animal se realizó en una etapa muy temprana de desarrollo siendo bastante crítica debido a la vulnerabilidad de las crías. (2) el marco temporal en el que se midió el contenido de ácido siálico del cerebro, así como la evaluación cognitiva de los animales; en este caso se realizó no sólo al destete sino también al año de recibir la suplementación. (3) la comparación del uso de ácido siálico en forma libre (Neu5Ac) o conjugada (6'-SL).

En el caso del presente experimento la mejora de la función cognitiva no parece estar relacionada con un mayor contenido de ácido siálico total en el cerebro puesto que dicho contenido fue el mismo para tres grupos experimentales tanto al destete como en la edad adulta. Según Wang et al., la concentración de ácido siálico unido a gangliósidos y a glicoproteínas en la corteza frontal del cerebro es mayor en los lactantes amamantados en comparación con los lactantes alimentados con fórmula [195]. En un estudio realizado con lechones, se observó que la suplementación con una fuente exógena de ácido siálico aumentaba su concentración en glicoproteínas de la corteza frontal [152]. Posteriormente, Jacobi et al., en un estudio también realizado en lechones también demostró que una fórmula suplementada con 6'-SL y 3'-SL

## DISCUSIÓN

aumentaba la cantidad de ácido siálico unido a gangliósidos en varias áreas del cerebro [155]. Como se describió anteriormente, Mudd et al. han publicado recientemente un estudio en el que los lechones fueron alimentados del día posnatal 2 al 32 con varias dietas que contenían diferentes dosis de sialilactosa y se observó un aumento de los niveles de ácido siálico en la corteza prefrontal, entre otras estructuras cerebrales [153]. Es decir, en la mayoría de estos estudios la determinación de ácido siálico se llevó a cabo en estructuras concretas del cerebro. Por el contrario, en nuestro estudio esa determinación de ácido siálico por HPLC se realizó en todo el hemisferio cerebral en lugar de en estructuras cerebrales individuales. Este hecho podría explicar la ausencia de diferencias significativas en el contenido total de ácido siálico entre grupos ya que éste parece tender a acumularse en ciertas estructuras cerebrales como la corteza frontal. Como hipótesis para explicar la diferencia de comportamiento entre grupos se podría plantear la opción de que un diferente contenido de ácido siálico en el cerebro de los distintos grupos experimentales en una fase muy temprana del desarrollo (incluso antes del destete) hubiese promovido tasas más altas de crecimiento axonal y conexiones mejoradas entre neuronas justificándose así las diferencias de comportamiento encontradas en la edad adulta.

Con el objeto de poder confirmar si dicha suplementación había provocado algún cambio composicional a nivel cerebral se decidió analizar también los niveles de expresión de las proteínas NCAM y PSA-NCAM en la corteza frontal de crías al destete. La NCAM es una proteína implicada en la estabilización y modulación de las conexiones neuronales [196]. El ácido poli siálico (PSA) es un homopolímero lineal de Neu5Ac con uniones  $\alpha$ 2-8. El PSA se agrega a la NCAM mediante un proceso postraducciona l regulado y varía según el desarrollo [197]. La polisialilación permite que las neuronas inmaduras crezcan y broten para conectar los complejos circuitos del cerebro, mientras que su regulación permite un ajuste de las interacciones célula-célula dependiente de NCAM. Siguiendo los hallazgos de los estudios previamente citados [152,155], nuestros resultados en ratas destetadas mostraron que la expresión de PSA-NCAM en la corteza frontal fue significativamente mayor en el grupo suplementado con 6'-SL en comparación con el suplementado con Neu5Ac y el control. Este resultado sugiere por tanto que la 6'-SL podría ser utilizada de manera preferente por el cerebro, mejorando el proceso de sialilación de proteínas

## DISCUSIÓN

altamente involucradas en el desarrollo cerebral. Estos niveles de PSA-NCAM explicarían también una mayor neuroplasticidad del grupo suplementado con 6'-SL.

Con respecto a la evaluación cognitiva, se implementaron varias pruebas de comportamiento que incluyeron el laberinto en Y con brazo bloqueado y el NORT, así como un nuevo paradigma cognitivo realizado en el sistema IntelliCage®. El laberinto en Y y el NORT se han utilizado en otros estudios previos en animales para evaluar los efectos de la nutrición en la cognición [189,190] y en este experimento se llevaron a cabo al destete y en la edad adulta. El paradigma en IntelliCage® solo se realizó en la edad adulta. Los datos de ratas destetadas no mostraron diferencias entre los grupos en ninguna de las pruebas de comportamiento. De hecho, como se comentó en el experimento 1, la realización de pruebas cognitivas a edades tempranas conlleva ciertos desafíos metodológicos. Leussis y Bolívar [192] señalaron que los roedores antes de y durante el destete tienden a habituarse más lentamente a entornos nuevos y muestran una baja actividad exploratoria en comparación con los animales adultos. Se ha sugerido que los animales jóvenes son más apropiados para la ejecución de tareas asociadas a recompensas. Según nuestra experiencia, la actividad física intensa y la falta de concentración en roedores muy jóvenes son los principales obstáculos que se encuentran al realizar la evaluación cognitiva de los animales de destete.

Por el contrario, se encontraron diferencias significativas en la evaluación de las habilidades cognitivas en la edad adulta. En el NORT, los grupos que reciben cualquier forma de ácido siálico durante la lactación distinguen mejor entre objetos nuevos y familiares que el grupo de control. Se ha sugerido que el deterioro de la corteza perirrinal [46], principal estructura cerebral involucrada en reconocimiento de objetos [172,198] podría ser la razón por la cual los animales obtienen peores resultados en esta tarea con la edad. Por ello, se podría especular que la exposición temprana al ácido siálico evitaría, en cierta forma, el deterioro cognitivo asociado a la edad, pero esta hipótesis debe ser confirmada por otros estudios. Los resultados obtenidos del paradigma IntelliCage® confirmaron que los animales que recibieron ácido siálico en la lactación tuvieron un rendimiento significativamente mejor que el grupo control en la edad adulta. En cuanto a la prueba del laberinto en Y, los animales suplementados con ácido siálico obtuvieron mejores resultados que las ratas control, ya que fueron capaces de reconocer el brazo nuevo

## DISCUSIÓN

fácilmente. Un hallazgo interesante que destacar fue que, dentro de los grupos suplementados con ácido siálico, las ratas que recibieron 6'-SL obtuvieron mejores resultados que los animales que recibieron Neu5Ac, lo que apuntaría a la 6'-SL como una mejor fuente de ácido siálico.

Un valor añadido de este experimento es que las evaluaciones cognitivas de los animales también fueron respaldadas por datos electrofisiológicos mediante mediciones de LTP *in vivo*. La LTP es el mecanismo básico para ciertos tipos de aprendizaje e involucra principalmente al hipocampo [171]. Los mejores resultados se observaron en los animales suplementados con ácido siálico y principalmente, los que recibieron 6'-SL, mientras que el rendimiento del grupo de control fue significativamente menor. Estos datos indicarían que la suplementación temprana con ácido siálico podría mejorar los procesos relacionados con la plasticidad neuronal.

Es de destacar que los animales de control tuvieron un rendimiento inferior en todas las pruebas en comparación con los grupos suplementados con ácido siálico. En el NORT, no hubo diferencias en el tiempo de exploración para ambos objetos. En el laberinto en Y, no se mostró preferencia por visitar primero el brazo bloqueado. En IntelliCage®, estos animales obtuvieron bajo porcentaje de visitas correctas y se encontró un bajo aumento en la amplitud de fEPSP en la LTP. Estos resultados mostrarían un cierto grado de deficiencia en los animales de control que podría explicarse por la menor cantidad de ácido siálico y/u otros nutrientes como los minerales [199] que recibieron durante el período de lactación.

Con respecto a las fuentes de ácido siálico utilizados en este estudio en este estudio, nuestros resultados muestran que el ácido siálico libre (Neu5Ac) fue menos eficaz que la 6'-SL, posiblemente porque el Neu5Ac se eliminaría más rápidamente en la orina y, por lo tanto, sería menos biodisponible. Nöhle y Schauer [200] publicaron que el metabolismo de los ácidos siálicos unidos a los oligosacáridos podría ser más lento que el del Neu5Ac, ya que los primeros requerirían un paso adicional de hidrólisis. Otros estudios parecen respaldar este hecho. Por ejemplo, en un estudio en un modelo de ratón de miopatía sintomática GNE, el tratamiento oral con 6'-SL condujo a una mayor restauración de la sialilación en el músculo y una mejora en el tamaño y la función muscular en comparación con el grupo tratado con ácido siálico libre [201].

## *DISCUSIÓN*

Los resultados obtenidos en este experimento indican así que el aporte de ácido siálico en la leche materna es necesario para el establecimiento de una red neuronal que garantice habilidades cognitivas duraderas. Un aporte bajo de ácido siálico durante este período crítico (lactación) puede conducir al envejecimiento prematuro de ciertas funciones cerebrales, mientras que se ha demostrado que un aporte exógeno de ácido siálico es efectivo para mantener las funciones cognitivas durante más tiempo. A su vez el ácido siálico en forma conjugada como 6'-SL parece ser más eficaz que la forma libre, posiblemente al ser más biodisponible.

Estos datos concuerdan con el experimento 1 en el que la suplementación temprana durante la lactancia con 2'-FL indujo mostró beneficios a nivel cognitivo en animales adultos [202]. Estos hechos dan importancia así al concepto de nutrición temprana [203] y al papel del ácido siálico en el desarrollo del cerebro.

### 6.3 Estudio clínico materno-infantil.

**Evaluación del efecto del estado metabólico materno sobre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL en la leche humana y su potencial influencia en el neurodesarrollo de los niños.**  
**Estudio clínico PREOBE.**

Dada su naturaleza y el diseño del estudio realizado en las parejas “madre-hijo”, éste ha de considerarse un estudio piloto de carácter retrospectivo. En él se analizaron muestras de leche materna madura obtenidas en el marco del estudio clínico PREOBE con el objeto de evaluar los efectos de factores metabólico-maternos como el sobrepeso/obesidad y la diabetes gestacional sobre las concentraciones de dos HMOs abundantes en la leche materna como son la 2'-FL y la 6'-SL. Los resultados mostraron que los niveles de 2'-FL y 6'-SL en la leche humana no están influidos por el peso materno pregestacional o la presencia de diabetes gestacional en la madre. Posteriormente, se evaluó también una posible asociación entre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL en la leche materna y las puntuaciones obtenidas por los bebés en el test BSDI-III. Se pudo comprobar una asociación positiva entre el contenido de 6'-SL en la leche humana y las puntuaciones obtenidas por los niños en la escala cognitiva del BSDI-III a los 18 meses de edad; Las concentraciones de leche materna de 2'-FL y 6'-SL también se asociaron positivamente con los resultados obtenidos por los bebés en la escala motora a los 6 y 18 meses de edad, respectivamente.

La composición en HMOs de la leche materna está principalmente determinada por la genética. Ciertos genes codifican enzimas involucradas en pasos de la biosíntesis de los HMOs, como el alargamiento, ramificación, fucosilación o sialilación y, por lo tanto, la variación en la expresión de dichas enzimas entre las mujeres lactantes da lugar a diferentes perfiles de HMOs en la leche materna. El impacto de otros factores maternos como la dieta, el estado de salud, la edad o la medicación que recibe podrían estar implicados en la síntesis de HMOs en la glándula mamaria humana, aunque su papel sigue sin estar del todo claro [87].



## DISCUSIÓN

En el caso del pIMC y el estado de diabetes gestacional, hay algunos estudios que han evaluado la influencia de estos factores en el perfil de HMOs de la leche materna. Smilowitz et al. analizaron muestras de leche obtenidas a las 2 semanas posparto de 24 madres que dieron a luz a término; 8 de esas 24 madres padecían DMG. Los resultados no mostraron diferencias en la cuantificación absoluta o el porcentaje relativo de HMOs entre la leche de mujeres con o sin DMG [204]. Aunque nuestro experimento se centró en las concentraciones de 2 HMOs, 2'-FL y 6'-SL, al contrario que en el trabajo de Smilowitz et al. donde se discutía sobre la cantidad total de HMOs, nuestros resultados también sugieren que la DMG no parece tener un impacto en el perfil de HMOs de la leche humana. Por su parte, Isganaitis et al. observaron diferencias significativas en 3 HMOs analizados mediante un método cromatográfico inespecífico en muestras de leche humana madura de 35 madres incluidas en dos grupos de estudio: madres con un pIMC < 25 (n=16, peso normal) o madres con pIMC ≥ 25 Kg/m<sup>2</sup> (n=15, sobrepeso/obesidad); los niveles de 2'-FL, lacto-N-fucopentanosas II/III y lacto-N-fucopentanosas I se asociaron significativamente con el pIMC materno tras ajustar por posibles factores de confusión. Esos resultados difieren así de los obtenidos en nuestro estudio para las concentraciones de 2'-FL donde no se encontraron diferencias entre los grupos. En el estudio PREOBE existían 3 grupos de estudio diferentes en función del pIMC, madres con peso normal, con sobrepeso y obesidad, mientras que el estudio de Isganaitis se incluyeron sólo dos grupos, peso normal y sujetos con sobrepeso/obesidad. Cabe destacar que en el estudio PREOBE también se realizó un análisis estadístico comparando los sujetos normales frente a las madres con sobrepeso/obesidad después de agrupar a las madres en un grupo (pIMC ≥ 25 Kg / m<sup>2</sup>), pero igualmente no se encontró una diferencia significativa frente a las madres sanas normopeso. En un reciente estudio observacional y transversal [36], se analizaron muestras de leche humana obtenidas entre los días 17 y 76 días posparto para detectar diferentes HMOs y se encontró una correlación positiva entre el pIMC y la concentración de 2'-FL en madres secretoras; sin embargo, esta diferencia no se mantuvo al considerar el fenotipo Lewis de la madre. Por otra parte, el número de sujetos con sobrepeso u obesidad no está claramente descrito en ese trabajo, lo que dificulta la comparación de estos resultados con los de nuestro estudio.

## DISCUSIÓN

El neurodesarrollo de los bebés se evaluó a los 6 y 18 meses de edad mediante el test BSID-III. Se encontró una asociación positiva entre el contenido de 6'-SL en las muestras de leche materna y las puntuaciones obtenidas por los lactantes a los 18 meses de edad en la escala cognitiva. La escala cognitiva en el test BSID-III consta de 91 puntos que evalúan el desarrollo sensori-motor, la exploración y la manipulación de objetos, la formación de conceptos y la memoria de los niños. Por lo tanto, los bebés completan tareas que miden su interés por la novedad, la atención a estímulos familiares y desconocidos, y la resolución de problemas [205]. Estos resultados clínicos están en consonancia con la investigación preclínica realizada en el experimento 2 que mostraba que una suplementación con 6'-SL durante el período de lactancia en crías de rata mejoraba los resultados cognitivos relacionados con la memoria y la LTP cuando los animales alcanzaban el año de edad [206]. Además, los datos del presente estudio también sugieren que las concentraciones de 6'-SL y 2'-FL estarían asociadas con las habilidades motoras de los bebés tras ajustar por posibles factores de confusión; este hecho es de especial trascendencia, pues el desarrollo psicomotor precede al desarrollo cognitivo existiendo una fuerte correlación positiva entre el desarrollo psicomotor en el primer año de vida y el desarrollo cognitivo a largo plazo. Sin embargo, la asociación 2'-FL con las puntuaciones motoras se pierde cuando la población se separa en niños cuyas madres presentaron concentraciones altas o bajas de 2'-FL en leche, probablemente debido a la baja cantidad de sujetos en cada grupo y/o la influencia de las parejas madre-bebé del grupo de baja 2'-FL. Además de los factores de confusión considerados en el análisis estadístico del presente estudio, la salud de los niños también está condicionada por ciertos factores biológicos, genéticos, conductuales y ambientales (físicos y sociales) que también podrían haber influido en su desarrollo neurológico y, por lo tanto, las puntuaciones obtenidas en el test BSID-III [207].

Aunque el test BSID-III inicialmente se diseñó como un instrumento de diagnóstico para identificar posibles retrasos en el desarrollo en niños con trastornos y discapacidades [208], en la última década se ha utilizado ampliamente para evaluar el neurodesarrollo de niños sanos sin ningún tipo de trastornos como es el caso del presente estudio, en el que se ha detectado una posible relación entre los resultados cognitivos y los niveles de 6'-SL en la leche materna a pesar de que los niños evaluados eran completamente sanos y no sufrían ningún trastorno del

## *DISCUSIÓN*

neurodesarrollo al encontrarse las puntuaciones obtenidas en todos los casos dentro de la normalidad. Sin embargo, el hecho de que el test BSDI-III se diseñara para niños con algún tipo de trastorno también podría explicar por qué en nuestro estudio no se llegó a detectar una asociación significativa entre las concentraciones de 2'-FL y las puntuaciones en la escala cognitiva del test BSDI-III dado que pequeñas diferencias entre niños sin ningún tipo de trastornos podrían pasar desapercibidas, máxime con la muestra reducida estudiada. De hecho, una de las limitaciones del presente estudio es el bajo número de parejas “madre-hijo” debido al reducido número de muestras de leche materna disponibles. Por tanto, debe resaltarse que este estudio se debe considerar como un estudio piloto que, sin embargo, puede ser útil como punto de partida para calcular el tamaño de muestra necesario para estudios futuros a gran escala que podrían tener como objetivo la evaluación de la influencia de las concentraciones de HMOs en leche materna sobre el neurodesarrollo de los niños.

Hasta donde se conoce, no hay publicaciones con datos clínicos que muestren una asociación de la concentración de HMOs en la leche humana con el neurodesarrollo en lactantes. Hata el momento, se han realizado ensayos clínicos para determinar los efectos de los HMOs en el crecimiento y la tolerancia en lactantes y para evaluar su respuesta inmune [129,130,166]; [129,130,166]; recientemente, Nieto-Ruiz A et al. [209], en un estudio llevado a cabo en lactantes que recibieron una fórmula infantil suplementada con ácido siálico, entre otros compuestos bioactivos, han publicado efectos positivos sobre el desarrollo cerebral, concretamente sobre el desarrollo de la retina y la agudeza visual. Una fortaleza del presente estudio clínico es, por tanto, el análisis de HMOs en la leche materna ligado a la evaluación cognitiva de los bebés que la recibían puesto que hasta la fecha no se ha llevado a cabo ninguna evaluación sobre los posibles efectos de los HMOs a nivel cognitivo en lactantes, aunque sí se han obtenido resultados de este tipo en modelos animales preclínicos. En este sentido, se han probado diferentes formas de suplementación con ácido siálico como la 6'-SL usando modelos preclínicos de lechones [152] y roedores [148,206] como en nuestro experimento 2, que muestran un impacto positivo en el rendimiento cognitivo. En algunos estudios, la suplementación con una fuente exógena de ácido siálico dió lugar a un aumento de dicho compuesto en ciertas áreas del cerebro [148,152,153,155]. Los HMOs fucosilados como la 2'-FL también se han evaluado en modelos

cognitivos de roedores. Estos estudios demostraron el papel de la 2'-FL administrado con la dieta en animales adultos [158,159] o mediante un suplemento oral durante el período de lactación en crías de ratas (Experimento 1) [202], en la funcionalidad del cerebro. Los resultados del presente estudio clínico parecen estar alineados con los hallazgos obtenidos a nivel preclínico en cuanto al papel positivo de los HMOs, en particular la 6'-SL y 2'-FL en el neurodesarrollo.

### **6.4 Discusión general.**

La presente tesis doctoral se diseñó con el objeto de poder abarcar las diferentes fases de una investigación, incluyendo una fase inicial preclínica, que brindara resultados iniciales acerca de cómo se comportaban los compuestos a evaluación, en este caso los HMOs, seguida de una fase clínica con datos obtenidos en seres humanos.

De hecho, como se ha descrito en la sección de resultados y en la discusión individual por experimentos, se ha podido confirmar que los resultados sobre el efecto a nivel cognitivo de los HMOs obtenidos en animales en la fase inicial están en consonancia con los obtenidos en la evaluación del neurodesarrollo de bebés incluidos en el estudio PREOBE.

Durante las últimas décadas, el concepto de nutrición temprana ha ganado un interés creciente. Actualmente, muchos estudios y proyectos internacionales están intentando dilucidar el papel de la nutrición durante el embarazo, la infancia y la niñez sobre el crecimiento y desarrollo individual, así como sus efectos metabólicos [210] y cognitivos [203] a largo plazo. La leche materna se considera la mejor opción de alimentación para el recién nacido y lactante debido a su adecuada proporción de nutrientes y a la presencia de una gran cantidad de componentes bioactivos. Los efectos beneficiosos de la leche humana en el desarrollo de la descendencia persisten no solo durante la infancia, sino que se extienden a toda la vida.

Varios estudios han demostrado la influencia de la lactancia materna sobre el desarrollo de las funciones cognitivas en los niños. Se ha demostrado que los adolescentes que fueron amamantados mostraron una corteza parietal más gruesa y una mejora en los resultados cognitivos con un coeficiente intelectual más alto, en comparación con sus homólogos

## DISCUSIÓN

alimentados con leche de fórmula [141]. La hipótesis más aceptada es que este efecto se debe a la composición de la leche humana, pero otros estudios también destacan la interacción “madre-hijo” durante la lactancia como un posible mecanismo para la mejora de los resultados cognitivos [142].

Se conoce que ciertos componentes de la leche humana desempeñan un papel importante en el desarrollo del cerebro; entre ellos, los LCPUFAs [143] o el colesterol [144] destacan como posibles candidatos para la mejora del desarrollo cognitivo. Respecto a los ácidos grasos, el DHA y el ácido araquidónico (ARA por sus siglas en inglés: *Arachidonic acid*) tienen un papel importante al ser constituyentes estructurales de las neuronas y de todas las estructuras del sistema nervioso, y se van a acumular de forma progresiva en el cerebro humano a partir del tercer trimestre de la gestación y durante los primeros meses de la vida. Los LC-PUFAs están presentes en la leche humana en proporciones mucho más elevadas que en la leche de vaca. Así, se ha observado que los lactantes que recibieron leche materna presentaron niveles más altos de DHA en el cerebro que aquellos alimentados con fórmula infantil [145] y despertó un gran interés habiendo sido postulado como candidato para la mejora del desarrollo cognitivo [146,147]. A los HMOs también se les han atribuido muchos efectos beneficiosos en el bebé, que van desde la prevención de infecciones intestinales [108] hasta la modulación del sistema inmunitario [89]. Más recientemente, se ha sugerido que también podrían tener un papel importante en el desarrollo cerebral, de hecho, como se ha descrito a lo largo de esta discusión existen diversos estudios *in vitro* e *in vivo* que han confirmado dicho papel tanto de los HMOs sialilados como fucosilados.

En la presente tesis doctoral se han demostrado efectos positivos, tanto de los compuestos fucosilados como la 2'-FL como sialilados como la 6'-SL, sobre la función cognitiva; dichos resultados se han obtenido no sólo en modelos preclínicos en roedores sino también mediante un estudio observacional en niños alimentados con leche materna en la que se midieron los niveles de ambos HMOs.

El/los mecanismo(s) de acción responsable(s) de dicha acción cognitiva por parte de los HMOs aún no está(n) claros. Actualmente se han lanzado diversas hipótesis que hablarían de dos tipos

## DISCUSIÓN

de mecanismos de acción que podrían ser no excluyentes, es decir, podrían incluso actuar al mismo tiempo.

En primer lugar, un mecanismo central mediante el cual los HMOs llegarían al cerebro a través de la circulación sistémica. La investigación preclínica ha demostrado que la administración de una fuente exógena de compuestos sialilados aumenta la concentración de ácido siálico en áreas clave del cerebro, lo que sugiere que el ácido siálico llegó al cerebro. Más concretamente, en nuestro experimento 2, la mejora en la función cognitiva observada en los grupos suplementados con ácido siálico podría ceñirse a una mayor adquisición de ácido siálico por parte del cerebro que provocaría un aumento en la polisialilación de la NCAM [211]; dicha polisialilación permite que las neuronas inmaduras crezcan y desarrollen una red axonal más densa para conectar los complejos circuitos del cerebro. En el caso de la 2'-FL, a pesar de que ha sido detectada en la orina y la sangre de bebés amamantados con leche materna [86] y, por lo tanto, podría llegar potencialmente a cualquier tejido u órgano del cuerpo, es poco probable que llegue intacta al cerebro [212].

En segundo lugar, un mecanismo por el cual los HMOs podrían interactuar con el GBA. Dicha interacción podría darse directamente mediante los propios HMOs o bien a través de los metabolitos derivados de la utilización de dichos HMOs por parte de la microbiota intestinal, la cual parece también tener un papel importante en la funcionalidad del GBA. El principal estudio que respalda esta hipótesis demostró que el efecto positivo en tareas de memoria y aprendizaje observado en roedores adultos que habían recibido una dieta suplementada con 2'-FL, se perdía en aquellos animales que habían sido vagotomizados [159]; este hallazgo demostraba que este efecto a nivel cognitivo dependía de la integridad nerviosa del nervio vago sugiriendo que el GBA juega un papel esencial en los beneficios cognitivos mediados por la 2'-FL. La microbiota intestinal también puede tener un papel importante en la interacción con el GBA [213,214] pero esto no está claro. Varios estudios han demostrado que los HMOs promueven el crecimiento de bacterias intestinales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* [215,216] por su acción prebiótica. Tarr et al. publicaron que una suplementación dietética con 6'-SL ó 3'-SL alteraba la microbiota colónica a la vez que disminuía las alteraciones estructurales de la mucosa colónica inducidas por el estrés, así como por la ansiedad [217]. Curiosamente, un estudio reciente derivado del estudio PREOBE

## *DISCUSIÓN*

ha demostrado una asociación entre la microbiota intestinal y el rendimiento cognitivo infantil a los 6 meses de edad [218].

En resumen, tanto la 2'-FL como la 6'-SL parecen tener efectos positivos a nivel cognitivo, sin embargo, se necesitan más investigaciones y estudios clínicos a gran escala para dilucidar los efectos de los HMO en el neurodesarrollo infantil, los mecanismos de acción involucrados e influencia de las poblaciones concentraciones bajas y altas de 2'-FL en leche humana, así como la extensión de los trabajos de investigación a otros HMOs que potencialmente también podrían ser efectivos a nivel del desarrollo cerebral.

## *7. CONCLUSIONES*





### CONCLUSIONES

- 1. La suplementación con 2'-fucosillactosa (2'-FL) durante el período de lactación en crías de rata tiene efectos positivos a nivel cognitivo que son principalmente observables a largo plazo.*
- 2. La suplementación con el ácido siálico N-acetilneuramínico, en forma libre (Neu5Ac) o conjugado (6'-sialillactosa, 6'-SL), en crías de rata durante el período de lactación tiene efectos positivos a nivel cognitivo que son principalmente observables a largo plazo. Aunque ambos compuestos son efectivos, se obtuvieron mejores resultados en el comportamiento y medidas electrofisiológicas con la 6'-SL que con el Neu5Ac.*
- 3. En el estudio piloto realizado en el presente trabajo en parejas "madre-hijo", no se ha podido demostrar que el índice de masa corporal o la diabetes gestacional maternas influyan en los niveles de los oligosacáridos 6'-SL y 2'-FL en la leche de estas mujeres.*
- 4. Se ha comprobado la existencia de asociaciones positivas entre las concentraciones de 6'-SL y 2'-FL en leche materna y las puntuaciones del test BSDI-III obtenidas por los hijos a los 6 y 18 meses de edad. Las concentraciones de 6'-SL en leche materna se asocian de forma positiva con el desarrollo cognitivo y motor de los hijos a los 18 meses de edad. En el caso de la 2'-FL dicha asociación es significativa con la función motora a los 6 meses de edad.*



## *8. RESUMEN*



## RESUMEN

La leche materna es la mejor fuente de alimentación que puede recibir un recién nacido y por ello se considera el “Patrón de Oro” de la alimentación infantil. La leche humana es una matriz compleja y dinámica que cambia en función de diversos factores genéticos, maternos y ambientales; el papel de algunos de estos factores aún no está claro en cuanto al contenido y perfil de ciertos componentes de la leche materna. Muchos de los componentes de la leche humana son compuestos bioactivos responsables en gran medida de sus efectos beneficiosos. Entre dichos compuestos encontramos los oligosacáridos de leche humana (Human milk oligosaccharides, HMOs) a los cuales se les ha atribuido múltiples efectos positivos en el bebé, que van desde la prevención de infecciones intestinales hasta la modulación del sistema inmunitario. Más recientemente, se ha sugerido que también podrían tener un papel importante en el desarrollo cerebral como lo demuestran diversos estudios *in vivo* e *in vitro*.

### **OBJETIVOS**

El presente estudio se ha realizado para investigar más profundamente en algunos de los aspectos mencionados y tiene como principales objetivos:

**Objetivo 1.** Demostrar el efecto de los HMOs, concretamente de la 2'-fucosillactosa (2'-FL) y la 6'-sialillactosa (6'-S), sobre la función cognitiva a largo plazo en modelos animales.

**Objetivo 2.** Explorar en humanos la influencia del sobrepeso, obesidad y la diabetes gestacional en embarazadas sobre las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL en la leche materna.

**Objetivo 3.** Determinar la influencia de las concentraciones de 2'-FL y 6'-SL presentes en la leche materna sobre el neurodesarrollo durante los primeros 18 meses de vida.

**METODOS Y RESULTADOS**

*Artículo 1.*

*Oliveros, E.; Ramirez, M.; Vazquez, E.; Barranco, A.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Buck, R.; Rueda, R.; Martin, M.J. Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats. J Nutr Biochem 2016, 31, 20-27.*

Diversas investigaciones han demostrado que los oligosacáridos de la leche humana podrían ejercer efectos beneficiosos sobre el desarrollo cerebral. Durante las últimas décadas, la mayoría de los estudios se han centrado en la evaluación de estructuras sialiladas, pero experimentos recientes también han probado oligosacáridos fucosilados, en particular la 2'-fucosillactosa (2'-FL). El presente estudio tuvo como objetivo determinar, en un modelo preclínico, si la 2'-FL administrada de forma oral tiene un efecto en el desarrollo cerebral en las etapas tempranas de la vida, para contribuir así a mejorar las habilidades cognitivas en etapas posteriores de la vida. Así, crías de rata recibieron un suplemento oral de 2'-FL (grupo 2'-FL) o agua (grupo control) durante el período de lactación. Posteriormente, los animales se mantuvieron con una dieta estándar para roedores. Las ratas se evaluaron dos veces, cuando tenían alrededor de 6 semanas y nuevamente a la edad de 1 año, utilizando para ello pruebas de comportamiento. La LTP *in vivo* también se realizó a las mismas edades. Ambos grupos mostraron un comportamiento similar cuando los animales fueron evaluados justo después del destete. A la edad de 1 año, las ratas del grupo 2'-FL tuvieron un rendimiento significativamente mejor en los test de reconocimiento de objeto nuevo y en el laberinto en Y, en comparación con los controles. Además, la LTP fue más intensa y de mayor duración en las ratas suplementadas con 2'-FL que en los animales del grupo control, tanto en animales jóvenes como adultos. La administración oral de 2'-FL exclusivamente durante la lactancia mejoró las capacidades cognitivas de los animales en la edad adulta.

**Artículo 2**

**Oliveros, E.;** Vazquez, E.; Barranco, A.; Ramirez, M.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Buck, R.; Rueda, R.; Martin, M.J. Sialic Acid and Sialylated Oligosaccharide Supplementation during Lactation Improves Learning and Memory in Rats. *Nutrients* 2018, 10(10), 1519.

El ácido siálico se ha postulado como uno de los compuestos que podría ejercer un papel importante a nivel del desarrollo cerebral. Este estudio evaluó los efectos del ácido siálico en el comportamiento de las ratas cuando se administra en forma libre como ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) o se conjuga como 6'-sialillactosa (6'-SL) durante la lactación. La leche de rata contiene ácido siálico, que alcanza su punto máximo en el día postnatal 9 y cae al mínimo para el día posnatal 15. Para evitar este pico de ácido siálico, se utilizó una cohorte de madres adoptivas para criar a las crías experimentales. Un grupo de crías recibió una suplementación oral diaria de Neu5Ac para imitar la cantidad naturalmente presente en la leche de rata, y otro grupo recibió la misma cantidad molar de ácido siálico como 6'-SL. El grupo control recibió agua. Después del destete, las ratas fueron sometidas a una evaluación del comportamiento. Un año después, se volvió a evaluar el comportamiento y se realizó la potenciación in vivo a largo plazo (Long term potentiation, LTP). Se recogieron y analizaron muestras de cerebro a ambas edades. Las ratas adultas que recibieron ácido siálico tuvieron un rendimiento significativamente mejor en la evaluación del comportamiento y mostraron una LTP mejorada en comparación con los animales controles. Dentro de los grupos suplementados con ácido siálico, las ratas del grupo 6'-SL mostraron mejores puntuaciones en algunos resultados cognitivos en comparación con las ratas que recibieron Neu5Ac. Al destete, solo se observó un efecto sobre los niveles de la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM) en la corteza frontal en ratas alimentadas con 6'-SL. La administración de ácido siálico durante la lactancia en ratas, especialmente como 6'-SL, mejora la memoria y la LTP en la edad adulta.



### **Borrador Artículo**

**Oliveros, E.;** Martin, M.J.; Torres-Espínola, F.J.; Segura-Moreno, M.T.; Ramírez, M.; Santos-Fandila, A.; Buck, R.; Rueda, R.; Escudero, M.; Catena, A.; Azaryah, H.; Campoy, C. Human milk levels of 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose are not impacted by maternal BMI or diabetic status and are positively associated with infant neurodevelopment.

Los oligosacáridos de la leche humana son el tercer componente sólido más abundante de la leche humana y están asociados con múltiples beneficios para la salud. No está claro si ciertos factores maternos influyen o no en las concentraciones de los oligosacáridos de la leche humana. En este estudio piloto, se han analizado las muestras de leche materna que se recogieron al mes postparto de mujeres con sobrepeso, obesidad, diabetes gestacional, y de un grupo de madres sanas normopeso, todas ellas participantes en el estudio PREOBE {[www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov), identifier (NCT01634464)}. Ochenta y dos muestras fueron analizadas mediante UHPLC-MS /MS para determinar las concentraciones de la 2'-fucosillactosa (2'-FL) y la 6'-sialilactosa (6'-SL). El desarrollo neurológico de los bebés de aquellas madres que proporcionaron muestras de leche se evaluó mediante el test Bayley III a los 6 y 18 meses de edad. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de 2'-FL ni 6'-SL entre los grupos de estudio. Se pudo comprobar una asociación positiva entre las concentraciones de 6'-SL en la leche materna y las puntuaciones obtenidas en las escalas cognitiva y motora por los lactantes a los 18 meses de edad. Se encontró una asociación entre las concentraciones de 2'-FL y la puntuación motora a los 6 meses de edad, aunque ésta desapareció al considerar los grupos de alta y baja concentración de 2'-FL por separado. Los niveles de 6'-SL y 2'-FL no se ven afectados por el índice de masa corporal materno preconcepcional o por el desarrollo de diabetes mellitus gestacional. Las concentraciones de 6'-SL en la leche materna se asoció a un mejor desarrollo cognitivo de los niños, aunque estos resultados necesitan ser confirmados con nuevos estudios clínicos a gran escala.

**CONCLUSIONES**

1. La suplementación con 2'-fucosillactosa (2'-FL) durante el período de lactación en crías de rata tiene efectos positivos a nivel cognitivo que son principalmente observables a largo plazo.
2. La suplementación con el ácido siálico N-acetilneuramínico, en forma libre (Neu5Ac) o conjugado (6'-sialillactosa, 6'-SL), en crías de rata durante el período de lactación tiene efectos positivos a nivel cognitivo que son principalmente observables a largo plazo. Aunque ambos compuestos son efectivos, se obtuvieron mejores resultados en el comportamiento y medidas electrofisiológicas con la 6'-SL que con el Neu5Ac.
3. En el estudio piloto realizado en el presente trabajo en parejas "madre-hijo", no se ha podido demostrar que el índice de masa corporal o la diabetes gestacional maternas influyan en los niveles de los oligosacáridos 6'-SL y 2'-FL en la leche de estas mujeres.
4. Se ha comprobado la existencia de asociaciones positivas entre las concentraciones de 6'-SL y 2'-FL en leche materna y las puntuaciones del test BSDI-III obtenidas por los hijos a los 6 y 18 meses de edad. Las concentraciones de 6'-SL en leche materna se asocian de forma positiva con el desarrollo cognitivo y motor de los hijos a los 18 meses de edad. En el caso de la 2'-FL dicha asociación es significativa con la función motora a los 6 meses de edad.



## *9. SUMMARY*



## SUMMARY

Breast milk is the best source of nutrition for newborns; thereby it is considered the "Gold Standard" of infant feeding. Human milk is a complex and dynamic matrix that changes depending on different genetic, maternal and environmental factors; the effect of some of these factors in relation to the content and profile of certain components of breast milk is still unclear. Many components of human milk are bioactive compounds responsible for beneficial effects observed in breastfed infants. Human milk oligosaccharides (HMOs) are within this group of compounds and it has been demonstrated that they are able to exert many positive effects such as the prevention of intestinal infections or immune system modulation. Lately, it has been also suggested that HMOs may also have an important role in brain development as supported by *in vivo* and *in vitro* studies.

### **OBJECTIVES**

The present study has been carried out to investigate some of the points mentioned above; the main objectives are:

**Objective 1.** Demonstrate the effect of HMOs, 2'-fucosyllactose (2'-FL) and 6'-sialyllactose (6'-S), on long-term cognitive functions in animal models.

**Objective 2.** Explore in humans the influence of overweight, obesity and gestational diabetes in pregnant women on the 2'-FL and 6'-SL human milk concentrations.

**Objective 3.** Determine the influence of 2'-FL and 6'-SL concentrations in breast milk on neurodevelopment in the first 18 months of life.

**METHODS AND RESULTS**

***Paper 1.***

*Oliveros, E.; Ramirez, M.; Vazquez, E.; Barranco, A.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Buck, R.; Rueda, R.; Martin, M.J. Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats. J Nutr Biochem 2016, 31, 20-27.*

Human milk oligosaccharides have been proposed to exert beneficial effects on brain development. During the last decades, most of the studies have focused on the evaluation of sialylated structures but recent experiments have also tested fucosylated oligosaccharides, i.e. 2'-fucosyllactose (2'-FL). The present study aimed to determine whether oral 2'-FL has an effect on the development of newborn brain, contributing to enhance cognitive skills later in life. Rat pups received an oral supplementation of 2'-FL (2'-FL group) or water (control group) during the lactation period. Thereafter, animals were maintained on a rodent standard diet. Rats (n = 12 rats/group) were evaluated twice, at age 4–6 weeks and again at age 1 year, using classical behavioral tests. *In vivo* long-term potentiation (LTP) was also performed at the same ages (n = 10 rats/group). Both groups showed similar behavior when the animals were assessed just after weaning (age 4–6 weeks), although the 2'-FL group seemed to perform slightly better in Morris Water Maze. At age 1 year, 2'-FL rats performed significantly better in the Novel Object Recognition and Y maze paradigms, when compared to controls. In addition, LTP was more intense and longer lasting in the rats supplemented with 2'-FL than in control animals, both in young and adult animals. Oral administration of 2'-FL exclusively during lactation enhanced cognitive abilities, not only in childhood but also in adulthood.

## SUMMARY

### **Paper 2.**

**Oliveros, E.; Vazquez, E.; Barranco, A.; Ramirez, M.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Buck, R.; Rueda, R.; Martin, M.J.** *Sialic Acid and Sialylated Oligosaccharide Supplementation during Lactation Improves Learning and Memory in Rats. Nutrients 2018, 10(10), 1519.*

Sialic acid is postulated to improve cognitive abilities. This study evaluated sialic acid effect on rat behavior when administered in a free form as N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) or conjugated as 6'-sialyllactose (6'-SL). Rat milk contains sialic acid, which peaks at postnatal day 9 and drops to a minimum by day 15. To bypass this sialic acid peak, a cohort of foster mothers was used to raise the experimental pups. A group of pups received a daily oral supplementation of Neu5Ac to mimic the amount naturally present in rat milk, and another group received the same molar amount of sialic acid as 6'-SL. The control group received water. After weaning, rats were submitted to behavioral evaluation. One year later, behavior was re-evaluated, and in vivo long-term potentiation (LTP) was performed. Brain samples were collected and analyzed at both ages. Adult rats who received sialic acid performed significantly better in the behavioral assessment and showed an enhanced LTP compared to controls. Within sialic acid groups, 6'-SL rats showed better scores in some cognitive outcomes compared to Neu5Ac rats. At weaning, an effect on polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) levels in the frontal cortex was only observed in 6t-SL fed rats. Providing sialic acid during lactation, especially as 6'-SL, improves memory and LTP in adult rats.



## SUMMARY

### **Draft paper.**

*Oliveros, E.; Martin, M.J.; Torres-Espínola, F.J.; Segura-Moreno, M.T.; Ramírez, M.; Santos-Fandila, A.; Buck, R.; Rueda, R.; Escudero, M.; Catena, A.; Azaryah, H.; Campoy, C. Human milk levels of 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose are not impacted by maternal BMI or diabetic status and are positively associated with infant neurodevelopment.*

Human milk oligosaccharides are the third most abundant solid component of human milk and are associated with multiple health benefits. Whether or not certain maternal factors influence human milk oligosaccharide concentrations remain unclear. In this pilot study, 1-month postpartum breast milk samples were collected from women with overweight, obesity, gestational diabetes, and a group mothers who were normal weight; all women were participants in the PREOBE study {[www. ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov), identifier (NCT01634464)}. Eighty-two samples were analyzed by UHPLC-MS/MS to determine 2'-fucosyllactose (2'-FL) and 6'-sialyllactose (6'-SL) concentrations. Neurodevelopment of infants from mothers providing breast milk samples was assessed by Bayley III scales at 6 and 18 months of age. No significant differences were found in 2'-FL or 6'-SL levels among study groups. A positive association was found between 6'-SL human milk concentrations and cognitive and motor scale scores in infants at 18 months of age. An association between 2'-FL concentrations and motor score at 6 months of age was found although it was lost when considering Low and High 2'-FL groups separately. 6'-SL and 2'-FL levels were not influenced by pre-conceptional maternal body mass index or the development of gestational diabetes mellitus. 6'-SL level in breast milk was associated with infant cognitive development although further novel research is needed.

**CONCLUSIONS**

1. 2'-fucosyllactose (2'-FL) supplementation during the lactation period in rat pups has positive cognitive effects that are mainly observable in the long term.
2. Supplementation with N-acetylneuraminic sialic acid, in free form (Neu5Ac) or conjugate (6'-sialyllactose, 6'-SL), in rat pups during the lactation period has positive effects at a cognitive level that are mainly observable in the long term. Although both compounds are effective, behavioral results and electrophysiological measurements are better when using 6'-SL than Neu5Ac.
3. In a pilot study with "mother-infant" pairs, it has not been observed that maternal body mass index or gestational diabetes influence the levels of 6'-SL and 2'-FL in breast milk.
4. A positive association is observed between 6'-SL and 2'-FL concentrations in breast milk and the results of the BSDI-III test in breastfed children; this association reached significance with cognitive and motor scale scores in the case of 6'-SL at 18 months of age, and with the psychomotor development in the case of 2'-FL at 6 months of age.



## *10. BIBLIOGRAFÍA*



## BIBLIOGRAFÍA

1. Lonnerdal, B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am J Clin Nutr* **2014**, *99*, 712S-717S, doi:10.3945/ajcn.113.071993.
2. Baro L., J.J., Martínez-Férez A, Bouza JJ. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharm* **2001**, *42*, 135-145.
3. Howie, P.W.; Forsyth, J.S.; Ogston, S.A.; Clark, A.; Florey, C.D. Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ* **1990**, *300*, 11-16, doi:10.1136/bmj.300.6716.11.
4. Saarinen, U.M.; Kajosaari, M. Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: prospective follow-up study until 17 years old. *Lancet* **1995**, *346*, 1065-1069, doi:10.1016/s0140-6736(95)91742-x.
5. Virtanen, S.M.; Knip, M. Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am J Clin Nutr* **2003**, *78*, 1053-1067, doi:10.1093/ajcn/78.6.1053.
6. Bauer, J.; Gerss, J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr* **2011**, *30*, 215-220, doi: 10.1016/j.clnu.2010.08.003.
7. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* **2013**, *60*, 49-74, doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002.
8. Bachour, P.; Yafawi, R.; Jaber, F.; Choueiri, E.; Abdel-Razzak, Z. Effects of smoking, mother's age, body mass index, and parity number on lipid, protein, and secretory immunoglobulin A concentrations of human milk. *Breastfeed Med* **2012**, *7*, 179-188, doi:10.1089/bfm.2011.0038.
9. Lonnerdal, B. Effects of maternal dietary intake on human milk composition. *J Nutr* **1986**, *116*, 499-513, doi:10.1093/jn/116.4.499.
10. Martin, C.R.; Ling, P.R.; Blackburn, G.L. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients* **2016**, *8*, doi:10.3390/nu8050279.
11. Jensen, R.G. Lipids in human milk. *Lipids* **1999**, *34*, 1243-1271.
12. Innis, S.M. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc* **2007**, *66*, 397-404, doi:10.1017/S0029665107005666.
13. Koletzko, B.; Rodriguez-Palmero, M.; Demmelmair, H.; Fidler, N.; Jensen, R.; Sauerwald, T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev* **2001**, *65 Suppl*, S3-S18.
14. Lonnerdal, B.; Forsum, E.; Hambraeus, L. A longitudinal study of the protein, nitrogen, and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers. *Am J Clin Nutr* **1976**, *29*, 1127-1133, doi:10.1093/ajcn/29.10.1127.

## BIBLIOGRAFÍA

15. Hambraeus, L.; Lonnerdal, B.; Forsum, E.; Gebre-Medhin, M. Nitrogen and protein components of human milk. *Acta Paediatr Scand* **1978**, *67*, 561-565.
16. Kunz, C.; Lonnerdal, B. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr* **1992**, *81*, 107-112.
17. Coppa, G.V.; Gabrielli, O.; Pierani, P.; Catassi, C.; Carlucci, A.; Giorgi, P.L. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* **1993**, *91*, 637-641.
18. Le Huerou-Luron, I.; Blat, S.; Boudry, G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev* **2010**, *23*, 23-36, doi:10.1017/S0954422410000065.
19. Panagos, P.; Matthan, N.; Sen, S. Effects of maternal obesity on breastmilk composition and infant growth (247.7). *The FASEB Journal* **2014**, *28*, 247.247, doi:10.1096/fasebj.28.1\_supplement.247.7.
20. De Luca, A.; Frasquet-Darrieux, M.; Gaud, M.A.; Christin, P.; Boquien, C.Y.; Millet, C.; Herviou, M.; Darmaun, D.; Robins, R.J.; Ingrand, P., et al. Higher Leptin but Not Human Milk Macronutrient Concentration Distinguishes Normal-Weight from Obese Mothers at 1-Month Postpartum. *PLoS One* **2016**, *11*, e0168568, doi:10.1371/journal.pone.0168568.
21. Panagos, P.G.; Vishwanathan, R.; Penfield-Cyr, A.; Matthan, N.R.; Shivappa, N.; Wirth, M.D.; Hebert, J.R.; Sen, S. Breastmilk from obese mothers has pro-inflammatory properties and decreased neuroprotective factors. *J Perinatol* **2016**, *36*, 284-290, doi:10.1038/jp.2015.199.
22. Isganaitis, E.; Venditti, S.; Matthews, T.J.; Lerin, C.; Demerath, E.W.; Fields, D.A. Maternal obesity and the human milk metabolome: associations with infant body composition and postnatal weight gain. *Am J Clin Nutr* **2019**, 10.1093/ajcn/nqy334, doi:10.1093/ajcn/nqy334.
23. Fujimori, M.; Franca, E.L.; Fiorin, V.; Morais, T.C.; Honorio-Franca, A.C.; de Abreu, L.C. Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. *BMC Pregnancy Childbirth* **2015**, *15*, 166, doi:10.1186/s12884-015-0574-4.
24. Garcia-Ravelo, S.; Diaz-Gomez, N.M.; Martin, M.V.; Dorta-Guerra, R.; Murray, M.; Escuder, D.; Rodriguez, C. Fatty Acid Composition and Eicosanoid Levels (LTE4 and PGE2) of Human Milk from Normal Weight and Overweight Mothers. *Breastfeed Med* **2018**, 10.1089/bfm.2017.0214, doi:10.1089/bfm.2017.0214.
25. Rudolph, M.C.; Young, B.E.; Lemas, D.J.; Palmer, C.E.; Hernandez, T.L.; Barbour, L.A.; Friedman, J.E.; Krebs, N.F.; MacLean, P.S. Early infant adipose deposition is positively associated with the n-

- 6 to n-3 fatty acid ratio in human milk independent of maternal BMI. *Int J Obes (Lond)* **2017**, *41*, 510-517, doi:10.1038/ijo.2016.211.
26. Makela, J.; Linderborg, K.; Niinikoski, H.; Yang, B.; Lagstrom, H. Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight women: the STEPS Study. *Eur J Nutr* **2013**, *52*, 727-735, doi:10.1007/s00394-012-0378-5.
27. Young, B.E.; Patinkin, Z.; Palmer, C.; de la Housseye, B.; Barbour, L.A.; Hernandez, T.; Friedman, J.E.; Krebs, N.F. Human milk insulin is related to maternal plasma insulin and BMI: but other components of human milk do not differ by BMI. *Eur J Clin Nutr* **2017**, *71*, 1094-1100, doi:10.1038/ejcn.2017.75.
28. Chan, D.; Goruk, S.; Becker, A.B.; Subbarao, P.; Mandhane, P.J.; Turvey, S.E.; Lefebvre, D.; Sears, M.R.; Field, C.J.; Azad, M.B. Adiponectin, leptin and insulin in breast milk: associations with maternal characteristics and infant body composition in the first year of life. *Int J Obes (Lond)* **2018**, *42*, 36-43, doi:10.1038/ijo.2017.189.
29. Fields, D.A.; Demerath, E.W. Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-alpha in human breast milk with infant growth and body composition. *Pediatr Obes* **2012**, *7*, 304-312, doi:10.1111/j.2047-6310.2012.00059.x.
30. Fields, D.A.; George, B.; Williams, M.; Whitaker, K.; Allison, D.B.; Teague, A.; Demerath, E.W. Associations between human breast milk hormones and adipocytokines and infant growth and body composition in the first 6 months of life. *Pediatr Obes* **2017**, *12 Suppl 1*, 78-85, doi:10.1111/ijpo.12182.
31. Cabrera-Rubio, R.; Collado, M.C.; Laitinen, K.; Salminen, S.; Isolauri, E.; Mira, A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* **2012**, *96*, 544-551, doi:10.3945/ajcn.112.037382.
32. Garcia-Mantrana, I.; Collado, M.C. Obesity and overweight: Impact on maternal and milk microbiome and their role for infant health and nutrition. *Mol Nutr Food Res* **2016**, *60*, 1865-1875, doi:10.1002/mnfr.201501018.
33. Gomez-Gallego, C.; Garcia-Mantrana, I.; Salminen, S.; Collado, M.C. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin Fetal Neonatal Med* **2016**, *21*, 400-405, doi:10.1016/j.siny.2016.05.003.
34. Bitman, J.; Hamosh, M.; Hamosh, P.; Lutes, V.; Neville, M.C.; Seacat, J.; Wood, D.L. Milk composition and volume during the onset of lactation in a diabetic mother. *Am J Clin Nutr* **1989**, *50*, 1364-1369, doi:10.1093/ajcn/50.6.1364.



## BIBLIOGRAFÍA

35. Smilowitz, J.T.; Totten, S.M.; Huang, J.; Grapov, D.; Durham, H.A.; Lammi-Keefe, C.J.; Lebrilla, C.; German, J.B. Human milk secretory immunoglobulin a and lactoferrin N-glycans are altered in women with gestational diabetes mellitus. *J Nutr* **2013**, *143*, 1906-1912, doi:10.3945/jn.113.180695.
36. Tonon K.M.; De Morais M.B.; Abrao A.C.F.V.; Miranda, A.M.T.B. Maternal and Infant Factors Associated with Human Milk Oligosaccharides Concentrations According to Secretor and Lewis Phenotypes. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11061358.
37. Kunz, C.; Rudloff, S.; Baier, W.; Klein, N.; Strobel, S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* **2000**, *20*, 699-722, doi:10.1146/annurev.nutr.20.1.69920/1/699.
38. Coppa, G.V.; Pierani, P.; Zampini, L.; Carloni, I.; Carlucci, A.; Gabrielli, O. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr Suppl* **1999**, *88*, 89-94.
39. Gabrielli, O.; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Padella, L.; Santoro, L.; Peila, C.; Giuliani, F.; Bertino, E.; Fabris, C.; Coppa, G.V. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* **2011**, *128*, e1520-1531, doi:10.1542/peds.2011-1206.
40. Bode, L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* **2012**, *22*, 1147-1162, doi:10.1093/glycob/cws074.
41. Tao, N.; Wu, S.; Kim, J.; An, H.J.; Hinde, K.; Power, M.L.; Gagneux, P.; German, J.B.; Lebrilla, C.B. Evolutionary glycomics: characterization of milk oligosaccharides in primates. *J Proteome Res* **2011**, *10*, 1548-1557, doi:10.1021/pr1009367.
42. Castanys-Munoz, E.; Martin, M.J.; Prieto, P.A. 2'-fucosyllactose: an abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. *Nutr Rev* **2013**, *71*, 773-789, doi:10.1111/nure.12079.
43. Bode, L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. **2012**.
44. Plaza-Diaz, J.; Fontana, L.; Gil, A. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10081038.
45. Totten, S.M.; Zivkovic, A.M.; Wu, S.; Ngyuen, U.; Freeman, S.L.; Ruhaak, L.R.; Darboe, M.K.; German, J.B.; Prentice, A.M.; Lebrilla, C.B. Comprehensive profiles of human milk oligosaccharides yield highly sensitive and specific markers for determining secretor status in lactating mothers. *J Proteome Res* **2012**, *11*, 6124-6133, doi:10.1021/pr300769g.

46. Albasser, M.M.; Davies, M.; Futter, J.E.; Aggleton, J.P. Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: Effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. *Behav Neurosci* **2009**, *123*, 115-124, doi:10.1037/a0013829.
47. Erney, R.M.; Malone, W.T.; Skelding, M.B.; Marcon, A.A.; Kleman-Leyer, K.M.; O'Ryan, M.L.; Ruiz-Palacios, G.; Hilty, M.D.; Pickering, L.K.; Prieto, P.A. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2000**, *30*, 181-192.
48. Sprenger, N.; Lee, L.Y.; De Castro, C.A.; Steenhout, P.; Thakkar, S.K. Longitudinal change of selected human milk oligosaccharides and association to infants' growth, an observatory, single center, longitudinal cohort study. *PLoS One* **2017**, *12*, e0171814, doi:10.1371/journal.pone.0171814.
49. Stahl, B.; Thurl, S.; Henker, J.; Siegel, M.; Finke, B.; Sawatzki, G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Adv Exp Med Biol* **2001**, *501*, 299-306, doi:10.1007/978-1-4615-1371-1\_37.
50. Kunz, C.; Meyer, C.; Collado, M.C.; Geiger, L.; Garcia-Mantrana, I.; Bertua-Rios, B.; Martinez-Costa, C.; Borsch, C.; Rudloff, S. Influence of Gestational Age, Secretor, and Lewis Blood Group Status on the Oligosaccharide Content of Human Milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2017**, *64*, 789-798, doi:10.1097/MPG.0000000000001402.
51. Ayeche-Muruzabal, V.; van Stigt, A.H.; Mank, M.; Willemsen, L.E.M.; Stahl, B.; Garsen, J.; Van't Land, B. Diversity of Human Milk Oligosaccharides and Effects on Early Life Immune Development. *Front Pediatr* **2018**, *6*, 239, doi:10.3389/fped.2018.00239.
52. Newburg, D.S.; Ruiz-Palacios, G.M.; Morrow, A.L. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr* **2005**, *25*, 37-58, doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092553.
53. Thurl, S.; Munzert, M.; Henker, J.; Boehm, G.; Muller-Werner, B.; Jelinek, J.; Stahl, B. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr* **2010**, *104*, 1261-1271, doi:10.1017/S0007114510002072.
54. Musumeci, M.; Simporé, J.; D'Agata, A.; Sotgiu, S.; Musumeci, S. Oligosaccharides in colostrum of Italian and Burkinabe women. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2006**, *43*, 372-378, doi:10.1097/01.mpg.0000228125.70971.af.
55. Ferrer-Admetlla, A.; Sikora, M.; Laayouni, H.; Esteve, A.; Roubinet, F.; Blancher, A.; Calafell, F.; Bertranpetit, J.; Casals, F. A natural history of FUT2 polymorphism in humans. *Mol Biol Evol* **2009**, *26*, 1993-2003, doi:10.1093/molbev/msp108.

56. Fumagalli, M.; Cagliani, R.; Pozzoli, U.; Riva, S.; Comi, G.P.; Menozzi, G.; Bresolin, N.; Sironi, M. Widespread balancing selection and pathogen-driven selection at blood group antigen genes. *Genome Res* **2009**, *19*, 199-212, doi:10.1101/gr.082768.108.
57. Messer, M.; Kerry, K.R. Milk carbohydrates of the echidna and the platypus. *Science* **1973**, *180*, 201-203, doi:10.1126/science.180.4082.201.
58. Urashima, T.; Saito, T.; Nakamura, T.; Messer, M. Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconj J* **2001**, *18*, 357-371.
59. Tao, N.; DePeters, E.J.; Freeman, S.; German, J.B.; Grimm, R.; Lebrilla, C.B. Bovine milk glycome. *J Dairy Sci* **2008**, *91*, 3768-3778, doi:10.3168/jds.2008-1305.
60. Tao, N.; Ochonicky, K.L.; German, J.B.; Donovan, S.M.; Lebrilla, C.B. Structural determination and daily variations of porcine milk oligosaccharides. *J Agric Food Chem* **2010**, *58*, 4653-4659, doi:10.1021/jf100398u.
61. Robinson, R.C. Structures and Metabolic Properties of Bovine Milk Oligosaccharides and Their Potential in the Development of Novel Therapeutics. *Front Nutr* **2019**, *6*, 50, doi:10.3389/fnut.2019.00050.
62. Nakamura, T.; Urashima, T.; Nakagawa, M.; Saito, T. Sialyllactose occurs as free lactones in ovine colostrum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1998**, *1381*, 286-292.
63. Aldredge, D.L.; Geronimo, M.R.; Hua, S.; Nwosu, C.C.; Lebrilla, C.B.; Barile, D. Annotation and structural elucidation of bovine milk oligosaccharides and determination of novel fucosylated structures. *Glycobiology* **2013**, doi:10.1093/glycob/cwt007.
64. Nakamura, T.; Urashima, T. The milk oligosaccharides of domestic farm animals. *Trends Glycosci Glycotechnol* **2004**, *16*, 135-142.
65. Segurel, L.; Thompson, E.E.; Flutre, T.; Lovstad, J.; Venkat, A.; Margulis, S.W.; Moyse, J.; Ross, S.; Gamble, K.; Sella, G., et al. The ABO blood group is a trans-species polymorphism in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 18493-18498, doi:10.1073/pnas.1210603109.
66. Jenness, R.; Erickson, A.W.; Craighead, J.J. Some comparative aspects of milk from four species of bears. *J Mammal* **1972**, *53*, 34-47.
67. Urashima, T.; Kawai, Y.; Nakamura, T.; Arai, I.; Saito, T.; Namiki, M.; Yamaoka, K.; Kawahawa, K.; Messer, M. Chemical characterisation of six oligosaccharides in a sample of colostrum of the brown capuchin, *Cebus apella* (Cebidae: primates). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **1999**, *124*, 295-300.

## BIBLIOGRAFÍA

68. Urashima, T.; Yamashita, T.; Nakamura, T.; Arai, I.; Saito, T.; Derocher, A.E.; Wiig, O. Chemical characterization of milk oligosaccharides of the polar bear, *Ursus maritimus*. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1475*, 395-408, doi: 10.1016/s0304-4165(00)00103-3.
69. Kunz, C.; Rudloff, S.; Schad, W.; Braun, D. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br J Nutr* **1999**, *82*, 391-399.
70. Kunz, C. Historical aspects of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr* **2012**, *3*, 430S-439S, doi:10.3945/an.111.001776.
71. Montreuil, J. The saga of human milk gynolactose. In Proceedings of New Perspectives in Infant Nutrition, Antwerp; Belgium pp. 3-11.
72. Polonowski, M.L., A. Sur deux nouveaux sucres du lait de femme, le gynolactose et l'allolactose. *C R Acad Sci Paris* **1931**, *132*, 1319.
73. Polonowski, M.; Montreuil, J. Étude chromatographique des polyosides du lait de femme. *C R Acad Sci Paris* **1954**, *238*, 2263-2264.
74. Gyorgy, P.; Norris, R.F.; Rose, C.S. Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch Biochem Biophys* **1954**, *48*, 193-201, doi:10.1016/0003-9861(54)90323-9.
75. Gyorgy, P.; Kuhn, R.; Rose, C.S.; Zilliken, F. Bifidus factor. II. Its occurrence in milk from different species and in other natural products. *Arch Biochem Biophys* **1954**, *48*, 202-208, doi:10.1016/0003-9861(54)90324-0.
76. Gyorgy, P.; Hoover, J.R.; Kuhn, R.; Rose, C.S. Bifidus factor. III. The rate of dialysis. *Arch Biochem Biophys* **1954**, *48*, 209-213, doi:10.1016/0003-9861(54)90325-2.
77. Grollman, E.F.; Ginsburg, V. Correlation between secretor status and the occurrence of 2'-fucosyllactose in human milk. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, *28*, 50-53, doi: 10.1016/0006-291x(67)90404-4.
78. Sabharwal, H.; Nilsson, B.; Chester, M.A.; Lindh, F.; Gronberg, G.; Sjoblad, S.; Lundblad, A. Oligosaccharides from faeces of a blood-group B, breast-fed infant. *Carbohydr Res* **1988**, *178*, 145-154, doi:10.1016/0008-6215(88)80107-1.
79. Sabharwal, H.; Nilsson, B.; Gronberg, G.; Chester, M.A.; Dakour, J.; Sjoblad, S.; Lundblad, A. Oligosaccharides from feces of preterm infants fed on breast milk. *Arch Biochem Biophys* **1988**, *265*, 390-406, doi:10.1016/0003-9861(88)90142-7.

80. Sabharwal, H.; Sjoblad, S.; Lundblad, A. Sialylated oligosaccharides in human milk and feces of preterm, full-term, and weaning infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1991**, *12*, 480-484, doi:10.1097/00005176-199105000-00012.
81. Engfer, M.B.; Stahl, B.; Finke, B.; Sawatzki, G.; Daniel, H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* **2000**, *71*, 1589-1596.
82. Gnoth, M.J.; Kunz, C.; Kinne-Saffran, E.; Rudloff, S. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J Nutr* **2000**, *130*, 3014-3020.
83. Rudloff, S.; Pohlentz, G.; Diekmann, L.; Egge, H.; Kunz, C. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr* **1996**, *85*, 598-603, doi:10.1111/j.1651-2227.1996.tb14095.x.
84. Rudloff, S.; Obermeier, S.; Borsch, C.; Pohlentz, G.; Hartmann, R.; Brosicke, H.; Lentze, M.J.; Kunz, C. Incorporation of orally applied (13)C-galactose into milk lactose and oligosaccharides. *Glycobiology* **2006**, *16*, 477-487, doi:10.1093/glycob/cwj092.
85. Rudloff, S.; Pohlentz, G.; Borsch, C.; Lentze, M.J.; Kunz, C. Urinary excretion of in vivo (1)(3)C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *Br J Nutr* **2012**, *107*, 957-963, doi:10.1017/S0007114511004016.
86. Goehring, K.C.; Kennedy, A.D.; Prieto, P.A.; Buck, R.H. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PLoS One* **2014**, *9*, e101692, doi:10.1371/journal.pone.0101692.
87. Bode, L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev* **2015**, *91*, 619-622, doi:10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001.
88. Roberfroid, M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* **2007**, *137*, 830S-837S, doi:10.1093/jn/137.3.830S.
89. Jantscher-Krenn, E.; Bode, L. Human milk oligosaccharides and their potential benefits for the breast-fed neonate. *Minerva Pediatr* **2012**, *64*, 83-99.
90. Asakuma, S.; Hatakeyama, E.; Urashima, T.; Yoshida, E.; Katayama, T.; Yamamoto, K.; Kumagai, H.; Ashida, H.; Hirose, J.; Kitaoka, M. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 34583-34592, doi:10.1074/jbc.M111.248138.
91. Lewis, Z.T.; Totten, S.M.; Smilowitz, J.T.; Popovic, M.; Parker, E.; Lemay, D.G.; Van Tassell, M.L.; Miller, M.J.; Jin, Y.-S.; German, J.B., et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut

- bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* **2015**, 3, 13, doi:10.1186/s40168-015-0071-z.
92. Yu, Z.-T.; Chen, C.; Newburg, D.S. Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology* **2013**, 10.1093/glycob/cwt065, doi:10.1093/glycob/cwt065.
93. Marcobal, A.; Barboza, M.; Froehlich, J.W.; Block, D.E.; German, J.B.; Lebrilla, C.B.; Mills, D.A. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J Agric Food Chem* **2010**, 58, 5334-5340, doi:10.1021/jf9044205.
94. Kitaoka, M.; Tian, J.; Nishimoto, M. Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl Environ Microbiol* **2005**, 71, 3158-3162, doi:10.1128/AEM.71.6.3158-3162.2005.
95. Wada, J.; Ando, T.; Kiyohara, M.; Ashida, H.; Kitaoka, M.; Yamaguchi, M.; Kumagai, H.; Katayama, T.; Yamamoto, K. *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl Environ Microbiol* **2008**, 74, 3996-4004, doi:10.1128/AEM.00149-08.
96. Miwa, M.; Horimoto, T.; Kiyohara, M.; Katayama, T.; Kitaoka, M.; Ashida, H.; Yamamoto, K. Cooperation of beta-galactosidase and beta-N-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology* **2010**, 20, 1402-1409, doi:10.1093/glycob/cwq101.
97. Yoshida, E.; Sakurama, H.; Kiyohara, M.; Nakajima, M.; Kitaoka, M.; Ashida, H.; Hirose, J.; Katayama, T.; Yamamoto, K.; Kumagai, H. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different beta-galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* **2012**, 22, 361-368, doi:10.1093/glycob/cwr116.
98. Van den Abbeele, P.D., C.; Vazquez, E.; Chow, J.; Buck, R.; Marzorati, M. 2'-Fucosyllactose alters the composition and activity of gut microbiota from formula-fed infants receiving complementary feeding in a validated intestinal model. *J Funct Foods* **2019**, 61, 103484.
99. Iskarpatyoti, J.A.; Morse, E.A.; McClung, R.P.; Ikizler, M.; Wetzel, J.D.; Contractor, N.; Dermody, T.S. Serotype-specific differences in inhibition of reovirus infectivity by human-milk glycans are determined by viral attachment protein sigma1. *Virology* **2012**, 433, 489-497, doi:10.1016/j.virol.2012.08.036.

100. Shang, J.; Piskarev, V.E.; Xia, M.; Huang, P.; Jiang, X.; Likhoshesterov, L.M.; Novikova, O.S.; Newburg, D.S.; Ratner, D.M. Identifying human milk glycans that inhibit norovirus binding using surface plasmon resonance. *Glycobiology* **2013**, *23*, 1491-1498, doi:10.1093/glycob/cwt077.
101. Angeloni, S.; Ridet, J.L.; Kusy, N.; Gao, H.; Crevoisier, F.; Guinchard, S.; Kochhar, S.; Sigrist, H.; Sprenger, N. Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology* **2005**, *15*, 31-41, doi:10.1093/glycob/cwh143.
102. Firon, N.; Ofek, I.; Sharon, N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydr Res* **1983**, *120*, 235-249, doi:10.1016/0008-6215(83)88019-7.
103. Hu, L.; Crawford, S.E.; Czako, R.; Cortes-Penfield, N.W.; Smith, D.F.; Le Pendu, J.; Estes, M.K.; Prasad, B.V.V. Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* **2012**, *485*, 256-259.
104. Simon, P.M.; Goode, P.L.; Mobasser, A.; Zopf, D. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect Immun* **1997**, *65*, 750-757.
105. Gustafsson, A.; Hultberg, A.; Sjöström, R.; Kacsóvics, I.; Breimer, M.E.; Boren, T.; Hammarström, L.; Holgersson, J. Carbohydrate-dependent inhibition of *Helicobacter pylori* colonization using porcine milk. *Glycobiology* **2006**, *16*, 1-10, doi:10.1093/glycob/cwj031.
106. Lin, A.E.; Autran, C.A.; Szyszka, A.; Escajadillo, T.; Huang, M.; Godula, K.; Prudden, A.R.; Boons, G.J.; Lewis, A.L.; Doran, K.S., et al. Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B *Streptococcus*. *J Biol Chem* **2017**, *292*, 11243-11249, doi:10.1074/jbc.M117.789974.
107. Andreas, N.J.; Al-Khalidi, A.; Jaiteh, M.; Clarke, E.; Hyde, M.J.; Modi, N.; Holmes, E.; Kampmann, B.; Mehring Le Doare, K. Role of human milk oligosaccharides in Group B *Streptococcus* colonisation. *Clin Transl Immunology* **2016**, *5*, e99, doi:10.1038/cti.2016.43.
108. Ruiz-Palacios, G.M.; Cervantes, L.E.; Ramos, P.; Chavez-Munguia, B.; Newburg, D.S. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 14112-14120, doi:10.1074/jbc.M207744200.
109. Morrow, A.L.; Ruiz-Palacios, G.M.; Altaye, M.; Jiang, X.; Guerrero, M.L.; Meinzen-Derr, J.K.; Farkas, T.; Chaturvedi, P.; Pickering, L.K.; Newburg, D.S. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* **2004**, *145*, 297-303, doi:10.1016/j.jpeds.2004.04.054.

## BIBLIOGRAFÍA

110. Su, S.V.; Gurney, K.B.; Lee, B. Sugar and spice: viral envelope-DC-SIGN interactions in HIV pathogenesis. *Curr HIV Res* **2003**, *1*, 87-99.
111. van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T.B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 697-709, doi:10.1038/nri1182.
112. Wu, L.; KewalRamani, V.N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* **2006**, *6*, 859-868, doi:10.1038/nri1960.
113. Zhu, X.; Borchers, C.; Bienstock, R.J.; Tomer, K.B. Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* **2000**, *39*, 11194-11204, doi:10.1021/bi000432m.
114. Doores, K.J.; Bonomelli, C.; Harvey, D.J.; Vasiljevic, S.; Dwek, R.A.; Burton, D.R.; Crispin, M.; Scanlan, C.N. Envelope glycans of immunodeficiency virions are almost entirely oligomannose antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 13800-13805, doi:10.1073/pnas.1006498107.
115. Naarding, M.A.; Ludwig, I.S.; Groot, F.; Berkhout, B.; Geijtenbeek, T.B.; Pollakis, G.; Paxton, W.A. Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 3256-3264, doi:10.1172/JCI25105.
116. van Liempt, E.; Bank, C.M.; Mehta, P.; Garcia-Vallejo, J.J.; Kwar, Z.S.; Geyer, R.; Alvarez, R.A.; Cummings, R.D.; Kooyk, Y.; van Die, I. Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett* **2006**, *580*, 6123-6131, doi:10.1016/j.febslet.2006.10.009.
117. Hong, P.; Ninonuevo, M.R.; Lee, B.; Lebrilla, C.; Bode, L. Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *Br J Nutr* **2009**, *101*, 482-486, doi:10.1017/s0007114508025804.
118. Downham, M.A.; Scott, R.; Sims, D.G.; Webb, J.K.; Gardner, P.S. Breast-feeding protects against respiratory syncytial virus infections. *Br Med J* **1976**, *2*, 274-276, doi:10.1136/bmj.2.6030.274.
119. Abrahams, S.W.; Labbok, M.H. Breastfeeding and otitis media: a review of recent evidence. *Curr Allergy Asthma Rep* **2011**, *11*, 508-512, doi:10.1007/s11882-011-0218-3.
120. Andersson, B.; Porras, O.; Hanson, L.A.; Lagergard, T.; Svanborg-Eden, C. Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect Dis* **1986**, *153*, 232-237.
121. Devaraj, N.; Sheykhnazari, M.; Warren, W.S.; Bhavanandan, V.P. Differential binding of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and cystic fibrosis tracheobronchial mucins. *Glycobiology* **1994**, *4*, 307-316, doi:10.1093/glycob/4.3.307.



## BIBLIOGRAFÍA

122. Pritt, B.S.; Clark, C.G. Amebiasis. *Mayo Clin Proc* **2008**, *83*, 1154-1159; quiz 1159-1160, doi:10.4065/83.10.1154.
123. Ackerman, D.L.; Craft, K.M.; Doster, R.S.; Weitkamp, J.H.; Aronoff, D.M.; Gaddy, J.A.; Townsend, S.D. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Human Milk Oligosaccharides against *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*. *ACS Infect Dis* **2018**, *4*, 315-324, doi:10.1021/acsinfecdis.7b00183.
124. Gonia, S.; Tuepker, M.; Heisel, T.; Autran, C.; Bode, L.; Gale, C.A. Human Milk Oligosaccharides Inhibit *Candida albicans* Invasion of Human Premature Intestinal Epithelial Cells. *J Nutr* **2015**, *145*, 1992-1998, doi:10.3945/jn.115.214940.
125. Kuntz, S.; Rudloff, S.; Kunz, C. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *Br J Nutr* **2008**, *99*, 462-471, doi:10.1017/S0007114507824068.
126. Kuntz, S.; Kunz, C.; Rudloff, S. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br J Nutr* **2009**, *101*, 1306-1315, doi:10.1017/S0007114508079622.
127. Lin, A.E.; Autran, C.A.; Espanola, S.D.; Bode, L.; Nizet, V. Human milk oligosaccharides protect bladder epithelial cells against uropathogenic *Escherichia coli* invasion and cytotoxicity. *J Infect Dis* **2014**, *209*, 389-398, doi:10.1093/infdis/jit464.
128. Eiwegger, T.; Stahl, B.; Schmitt, J.; Boehm, G.; Gerstmayr, M.; Pichler, J.; Dehlink, E.; Loibichler, C.; Urbanek, R.; Szepefalusi, Z. Human milk--derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatr Res* **2004**, *56*, 536-540, doi:10.1203/01.PDR.0000139411.35619.B4.
129. Marriage, B.J.; Buck, R.H.; Goehring, K.C.; Oliver, J.S.; Williams, J.A. Infants Fed a Lower Calorie Formula With 2'FL Show Growth and 2'FL Uptake Like Breast-Fed Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2015**, *61*, 649-658, doi:10.1097/MPG.0000000000000889.
130. Goehring, K.C.; Marriage, B.J.; Oliver, J.S.; Wilder, J.A.; Barrett, E.G.; Buck, R.H. Similar to Those Who Are Breastfed, Infants Fed a Formula Containing 2'-Fucosyllactose Have Lower Inflammatory Cytokines in a Randomized Controlled Trial. *J Nutr* **2016**, *146*, 2559-2566, doi:10.3945/jn.116.236919.
131. Bode, L. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J Nutr* **2006**, *136*, 2127-2130, doi:10.1093/jn/136.8.2127.

132. Bode, L. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutr Rev* **2009**, *67 Suppl 2*, S183-191, doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00239.x.
133. Bode, L.; Kunz, C.; Muhly-Reinholz, M.; Mayer, K.; Seeger, W.; Rudloff, S. Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost* **2004**, *92*, 1402-1410, doi:10.1160/TH04-01-0055.
134. Bode, L.; Rudloff, S.; Kunz, C.; Strobel, S.; Klein, N. Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil beta 2 integrin expression. *J Leukoc Biol* **2004**, *76*, 820-826, doi:10.1189/jlb.0304198.
135. Castillo-Courtade, L.; Han, S.; Lee, S.; Mian, F.M.; Buck, R.; Forsythe, P. Attenuation of food allergy symptoms following treatment with human milk oligosaccharides in a mouse model. *Allergy* **2015**, *70*, 1091-1102, doi:10.1111/all.12650.
136. Sprenger, N.; Odenwald, H.; Kukkonen, A.K.; Kuitunen, M.; Savilahti, E.; Kunz, C. FUT2-dependent breast milk oligosaccharides and allergy at 2 and 5 years of age in infants with high hereditary allergy risk. *Eur J Nutr* **2017**, *56*, 1293-1301, doi:10.1007/s00394-016-1180-6.
137. Eidelman, A.I. Breastfeeding and the use of human milk: an analysis of the American Academy of Pediatrics 2012 Breastfeeding Policy Statement. *Breastfeed Med* **2012**, *7*, 323-324, doi:10.1089/bfm.2012.0067.
138. Jantscher-Krenn, E.; Zherebtsov, M.; Nissan, C.; Goth, K.; Guner, Y.S.; Naidu, N.; Choudhury, B.; Grishin, A.V.; Ford, H.R.; Bode, L. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut* **2012**, *61*, 1417-1425, doi:10.1136/gutjnl-2011-301404.
139. Autran, C.A.; Schoterman, M.H.; Jantscher-Krenn, E.; Kamerling, J.P.; Bode, L. Sialylated galacto-oligosaccharides and 2'-fucosyllactose reduce necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Br J Nutr* **2016**, *116*, 294-299, doi:10.1017/S0007114516002038.
140. Good, M.; Sodhi, C.P.; Yamaguchi, Y.; Jia, H.; Lu, P.; Fulton, W.B.; Martin, L.Y.; Prindle, T.; Nino, D.F.; Zhou, Q., et al. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose attenuates the severity of experimental necrotising enterocolitis by enhancing mesenteric perfusion in the neonatal intestine. *Br J Nutr* **2016**, *116*, 1175-1187, doi:10.1017/S0007114516002944.
141. Kafouri, S.; Kramer, M.; Leonard, G.; Perron, M.; Pike, B.; Richer, L.; Toro, R.; Veillette, S.; Pausova, Z.; Paus, T. Breastfeeding and brain structure in adolescence. *Int J Epidemiol* **2013**, *42*, 150-159, doi:10.1093/ije/dys172.

142. Newton, N. The uniqueness of human milk. Psychological differences between breast and bottle feeding. *Am J Clin Nutr* **1971**, *24*, 993-1004, doi:10.1093/ajcn/24.8.993.
143. Caspi, A.; Williams, B.; Kim-Cohen, J.; Craig, I.W.; Milne, B.J.; Poulton, R.; Schalkwyk, L.C.; Taylor, A.; Werts, H.; Moffitt, T.E. Moderation of breastfeeding effects on the IQ by genetic variation in fatty acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 18860-18865, doi:10.1073/pnas.0704292104.
144. Isaacs, E.B.; Fischl, B.R.; Quinn, B.T.; Chong, W.K.; Gadian, D.G.; Lucas, A. Impact of breast milk on intelligence quotient, brain size, and white matter development. *Pediatr Res* **2010**, *67*, 357-362, doi:10.1203/PDR.0b013e3181d026da.
145. Makrides, M.; Neumann, M.A.; Byard, R.W.; Simmer, K.; Gibson, R.A. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* **1994**, *60*, 189-194, doi:10.1093/ajcn/60.2.189.
146. Makrides, M.; Smithers, L.G.; Gibson, R.A. Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in neurodevelopment and growth. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **2010**, *65*, 123-133; discussion 133-126, doi:10.1159/000281154.
147. Gibson, R.A.; Makrides, M. Long-chain polyunsaturated fatty acids in breast milk: are they essential? *Adv Exp Med Biol* **2001**, *501*, 375-383, doi:10.1007/978-1-4615-1371-1\_46.
148. Morgan, B.L.; Winick, M. Effects of administration of N-acetylneuraminic acid (NANA) on brain NANA content and behavior. *J Nutr* **1980**, *110*, 416-424.
149. Wang, B.; Downing, J.A.; Petocz, P.; Brand-Miller, J.; Bryden, W.L. Metabolic fate of intravenously administered N-acetylneuraminic acid-6-14C in newborn piglets. *Asia Pac J Clin Nutr* **2007**, *16*, 110-115.
150. Carlson, S.E.; House, S.G. Oral and intraperitoneal administration of N-acetylneuraminic acid: effect on rat cerebral and cerebellar N-acetylneuraminic acid. *J Nutr* **1986**, *116*, 881-886.
151. Scholtz, S.A.; Gottipati, B.S.; Gajewski, B.J.; Carlson, S.E. Dietary sialic acid and cholesterol influence cortical composition in developing rats. *J Nutr* **2013**, *143*, 132-135, doi:10.3945/jn.112.169508.
152. Wang, B.; Yu, B.; Karim, M.; Hu, H.; Sun, Y.; McGreevy, P.; Petocz, P.; Held, S.; Brand-Miller, J. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *Am J Clin Nutr* **2007**, *85*, 561-569, doi: 10.1093/ajcn/85.2.561.
153. Mudd, A.T.; Fleming, S.A.; Labhart, B.; Chichlowski, M.; Berg, B.M.; Donovan, S.M.; Dilger, R.N. Dietary Sialyllactose Influences Sialic Acid Concentrations in the Prefrontal Cortex and Magnetic

- Resonance Imaging Measures in Corpus Callosum of Young Pigs. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/nu9121297.
154. Fleming, S.A.; Chichlowski, M.; Berg, B.M.; Donovan, S.M.; Dilger, R.N. Dietary Sialyllactose Does Not Influence Measures of Recognition Memory or Diurnal Activity in the Young Pig. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10040395.
155. Jacobi, S.K.; Yatsunenkov, T.; Li, D.; Dasgupta, S.; Yu, R.K.; Berg, B.M.; Chichlowski, M.; Odle, J. Dietary Isomers of Sialyllactose Increase Ganglioside Sialic Acid Concentrations in the Corpus Callosum and Cerebellum and Modulate the Colonic Microbiota of Formula-Fed Piglets. *J Nutr* **2016**, *146*, 200-208, doi:10.3945/jn.115.220152.
156. Matthies, H.; Staak, S.; Krug, M. Fucose and fucosyllactose enhance in-vitro hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* **1996**, *725*, 276-280, doi: 10.1016/0006-8993(96)00406-4.
157. Krug, M.; Wagner, M.; Staak, S.; Smalla, K.H. Fucose and fucose-containing sugar epitopes enhance hippocampal long-term potentiation in the freely moving rat. *Brain Res* **1994**, *643*, 130-135.
158. Vazquez, E.; Barranco, A.; Ramirez, M.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Martinez-Lara, E.; Blanco, S.; Martin, M.J.; Castanys, E.; Buck, R., et al. Effects of a human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, on hippocampal long-term potentiation and learning capabilities in rodents. *J Nutr Biochem* **2015**, *26*, 455-465, doi:10.1016/j.jnutbio.2014.11.016.
159. Vazquez, E.; Barranco, A.; Ramirez, M.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Jimenez, M.L.; Buck, R.; Rueda, R. Dietary 2'-Fucosyllactose Enhances Operant Conditioning and Long-Term Potentiation via Gut-Brain Communication through the Vagus Nerve in Rodents. *PLoS One* **2016**, *11*, e0166070, doi:10.1371/journal.pone.0166070.
160. Carabotti, M.; Scirocco, A.; Maselli, M.A.; Severi, C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* **2015**, *28*, 203-209.
161. Breit, S.; Kupferberg, A.; Rogler, G.; Hasler, G. Vagus Nerve as Modulator of the Brain-Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Front Psychiatry* **2018**, *9*, 44, doi:10.3389/fpsy.2018.00044.
162. Burokas, A.; Moloney, R.D.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Microbiota regulation of the Mammalian gut-brain axis. *Adv Appl Microbiol* **2015**, *91*, 1-62, doi:10.1016/bs.aambs.2015.02.001.
163. Smith-Brown, P.; Morrison, M.; Krause, L.; Davies, P.S. Mothers Secretor Status Affects Development of Childrens Microbiota Composition and Function: A Pilot Study. *PLoS One* **2016**, *11*, e0161211, doi:10.1371/journal.pone.0161211.

## BIBLIOGRAFÍA

164. Kuhn, L.; Kim, H.Y.; Hsiao, L.; Nissan, C.; Kankasa, C.; Mwiya, M.; Thea, D.M.; Aldrovandi, G.M.; Bode, L. Oligosaccharide composition of breast milk influences survival of uninfected children born to HIV-infected mothers in Lusaka, Zambia. *J Nutr* **2015**, *145*, 66-72, doi:10.3945/jn.114.199794.
165. Kajzer, J.O., J.; Marriage, B. Gastrointestinal tolerance of formula supplemented with oligosaccharides. *FASEB J.* **2016**, 671.
166. Puccio, G.; Alliet, P.; Cajozzo, C.; Janssens, E.; Corsello, G.; Sprenger, N.; Wernimont, S.; Egli, D.; Gosoni, L.; Steenhout, P. Effects of Infant Formula With Human Milk Oligosaccharides on Growth and Morbidity: A Randomized Multicenter Trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2017**, *64*, 624-631, doi:10.1097/MPG.0000000000001520.
167. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **1993**, *123*, 1939-1951, doi:10.1093/jn/123.11.1939.
168. Paxinos G, W.C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *San Diego, CA: Academic press* **1986**.
169. Gureviciene, I.; Ikonen, S.; Gurevicius, K.; Sarkaki, A.; van Groen, T.; Pussinen, R.; Ylinen, A.; Tanila, H. Normal induction but accelerated decay of LTP in APP + PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* **2004**, *15*, 188-195, doi:10.1016/j.nbd.2003.11.011.
170. Bliss, T.V.; Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **1973**, *232*, 331-356, doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010273.
171. Gruart, A.; Munoz, M.D.; Delgado-Garcia, J.M. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci* **2006**, *26*, 1077-1087, doi:10.1523/JNEUROSCI.2834-05.2006.
172. Ennaceur, A.; Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* **1988**, *31*, 47-59.
173. Dellu, F.; Mayo, W.; Cherkaoui, J.; Le Moal, M.; Simon, H. A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Res* **1992**, *588*, 132-139.
174. Sprenger, N.; Duncan, P.I. Sialic acid utilization. *Adv Nutr* **2012**, *3*, 392S-397S, doi:10.3945/an.111.001479.
175. Dickson, J.J.; Messer, M. Intestinal neuraminidase activity of suckling rats and other mammals. Relationship to the sialic acid content of milk. *Biochem J* **1978**, *170*, 407-413.

## BIBLIOGRAFÍA

176. Hara, S.; Takemori, Y.; Yamaguchi, M.; Nakamura, M.; Ohkura, Y. Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal Biochem* **1987**, *164*, 138-145, doi:0003-2697(87)90377-0 [pii].
177. Martin, M.J.; Vazquez, E.; Rueda, R. Application of a sensitive fluorometric HPLC assay to determine the sialic acid content of infant formulas. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *387*, 2943-2949, doi:10.1007/s00216-007-1160-z.
178. Berglund, S.K.; Garcia-Valdes, L.; Torres-Espinola, F.J.; Segura, M.T.; Martinez-Zaldivar, C.; Aguilar, M.J.; Agil, A.; Lorente, J.A.; Florido, J.; Padilla, C., et al. Maternal, fetal and perinatal alterations associated with obesity, overweight and gestational diabetes: an observational cohort study (PREOBE). *BMC Public Health* **2016**, *16*, 207, doi:10.1186/s12889-016-2809-3.
179. Torres-Espinola, F.J.; Berglund, S.K.; Garcia-Valdes, L.M.; Segura, M.T.; Jerez, A.; Campos, D.; Moreno-Torres, R.; Rueda, R.; Catena, A.; Perez-Garcia, M., et al. Maternal Obesity, Overweight and Gestational Diabetes Affect the Offspring Neurodevelopment at 6 and 18 Months of Age--A Follow Up from the PREOBE Cohort. *PLoS One* **2015**, *10*, e0133010, doi:10.1371/journal.pone.0133010.
180. de la Garza Puentes, A.; Montes Goyanes, R.; Chisaguano Tonato, A.M.; Torres-Espinola, F.J.; Arias Garcia, M.; de Almeida, L.; Bonilla Aguirre, M.; Guerendiain, M.; Castellote Bargallo, A.I.; Segura Moreno, M., et al. Association of maternal weight with FADS and ELOVL genetic variants and fatty acid levels- The PREOBE follow-up. *PLoS One* **2017**, *12*, e0179135, doi:10.1371/journal.pone.0179135.
181. Torres-Espinola, F.J.; Berglund, S.K.; Garcia, S.; Perez-Garcia, M.; Catena, A.; Rueda, R.; Saez, J.A.; Campoy, C.; team, P. Visual evoked potentials in offspring born to mothers with overweight, obesity and gestational diabetes. *PLoS One* **2018**, *13*, e0203754, doi:10.1371/journal.pone.0203754.
182. Albers, C.A.; Grieve, A.J. Test Review: Bayley, N. (2006). Bayley Scales of Infant and Toddler Development-- Third Edition. San Antonio, TX: Harcourt Assessment. *Journal of Psychoeducational Assessment* **2007**, *25*, 180-190, doi:10.1177/0734282906297199.
183. Bayley, N. *Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 3rd edn*; San Antonio: TX: Harcourt Assessment: **2006**.
184. Santos-Fandila, A.; Zafra-Gomez, A.; Vazquez, E.; Navalon, A.; Rueda, R.; Ramirez, M. Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination

- of soluble milk glycans in rat serum. *Talanta* **2014**, *118*, 137-146, doi:10.1016/j.talanta.2013.10.013.
185. Thurl, S.; Munzert, M.; Boehm, G.; Matthews, C.; Stahl, B. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutr Rev* **2017**, *75*, 920-933, doi:10.1093/nutrit/nux044.
186. Albrecht, S.; Lane, J.A.; Marino, K.; Al Busadah, K.A.; Carrington, S.D.; Hickey, R.M.; Rudd, P.M. A comparative study of free oligosaccharides in the milk of domestic animals. *Br J Nutr* **2014**, *111*, 1313-1328, doi:10.1017/S0007114513003772.
187. Broadbent, N.J.; Squire, L.R.; Clark, R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 14515-14520, doi:10.1073/pnas.0406344101.
188. Antunes, M.; Biala, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* **2012**, *13*, 93-110, doi:10.1007/s10339-011-0430-z.
189. Hiratsuka, S.; Honma, H.; Saitoh, Y.; Yasuda, Y.; Yokogoshi, H. Effects of Dietary Sialic Acid in n-3 Fatty Acid-Deficient Dams during Pregnancy and Lactation on the Learning Abilities of Their Pups after Weaning. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **2013**, *59*, 136-143.
190. Cutuli, D.; De Bartolo, P.; Caporali, P.; Laricchiuta, D.; Foti, F.; Ronci, M.; Rossi, C.; Neri, C.; Spalletta, G.; Caltagirone, C., et al. n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation enhances hippocampal functionality in aged mice. *Front Aging Neurosci* **2014**, *6*, 220, doi:10.3389/fnagi.2014.00220.
191. Karimi, S.A.; Salehi, I.; Komaki, A.; Sarihi, A.; Zarei, M.; Shahidi, S. Effect of high-fat diet and antioxidants on hippocampal long-term potentiation in rats: an in vivo study. *Brain Res* **2013**, *1539*, 1-6, doi:10.1016/j.brainres.2013.09.029.
192. Leussis, M.P.; Bolivar, V.J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev* **2006**, *30*, 1045-1064, doi:10.1016/j.neubiorev.2006.03.006.
193. Burke, S.N.; Wallace, J.L.; Hartzell, A.L.; Nematollahi, S.; Plange, K.; Barnes, C.A. Age-associated deficits in pattern separation functions of the perirhinal cortex: a cross-species consensus. *Behav Neurosci* **2011**, *125*, 836-847, doi:10.1037/a0026238.
194. Ryan, M.M.; Guevremont, D.; Luxmanan, C.; Abraham, W.C.; Williams, J.M. Aging alters long-term potentiation--related gene networks and impairs synaptic protein synthesis in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging* **2015**, *36*, 1868-1880, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.012.
195. Wang, B.; McVeagh, P.; Petocz, P.; Brand-Miller, J. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* **2003**, *78*, 1024-1029.

196. Wang, B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu Rev Nutr* **2009**, *29*, 177-222, doi:10.1146/annurev.nutr.28.061807.155515.
197. Wang, B. Molecular Mechanism Underlying Sialic Acid as an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **2012**, *3*, 465S-472S, doi:10.3945/an.112.001875.
198. Aggleton, J.P.; Albasser, M.M.; Aggleton, D.J.; Poirier, G.L.; Pearce, J.M. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behav Neurosci* **2010**, *124*, 55-68, doi:10.1037/a0018320.
199. Keen, C.L.; Lonnerdal, B.; Clegg, M.; Hurley, L.S. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J Nutr* **1981**, *111*, 226-236, doi:10.1093/jn/111.2.226.
200. Nohle, U.; Schauer, R. Metabolism of sialic acids from exogenously administered sialyllactose and mucin in mouse and rat. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1984**, *365*, 1457-1467.
201. Yonekawa, T.; Malicdan, M.C.; Cho, A.; Hayashi, Y.K.; Nonaka, I.; Mine, T.; Yamamoto, T.; Nishino, I.; Noguchi, S. Sialyllactose ameliorates myopathic phenotypes in symptomatic GNE myopathy model mice. *Brain* **2014**, *137*, 2670-2679, doi:10.1093/brain/awu210.
202. Oliveros, E.; Ramirez, M.; Vazquez, E.; Barranco, A.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Buck, R.; Rueda, R.; Martin, M.J. Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats. *J Nutr Biochem* **2016**, *31*, 20-27, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.014.
203. Anjos, T.; Altmae, S.; Emmett, P.; Tiemeier, H.; Closa-Monasterolo, R.; Luque, V.; Wiseman, S.; Perez-Garcia, M.; Lattka, E.; Demmelmair, H., et al. Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur J Nutr* **2013**, *52*, 1825-1842, doi:10.1007/s00394-013-0560-4.
204. Ruiz-Moyano, S.; Totten, S.M.; Garrido, D.A.; Smilowitz, J.T.; German, J.B.; Lebrilla, C.B.; Mills, D.A. Variation in consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated strains of *Bifidobacterium breve*. *Appl Environ Microbiol* **2013**, *79*, 6040-6049, doi:10.1128/AEM.01843-13.
205. Piñon, M. Theoretical Background and Structure of the Bayley Scales of Infant and Toddler Development, Third Edition. In *Bayley-III Clinical Use and Interpretation*, Weiss, L.G.O., T.; Aylward, G.P., Ed. Academic Press: San Diego, 2010; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374177-6.10001-7>pp. 1-28.



## BIBLIOGRAFÍA

206. Oliveros, E.; Vazquez, E.; Barranco, A.; Ramirez, M.; Gruart, A.; Delgado-Garcia, J.M.; Buck, R.; Rueda, R.; Martin, M.J. Sialic Acid and Sialylated Oligosaccharide Supplementation during Lactation Improves Learning and Memory in Rats. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10101519.
207. In *Children's Health, The Nation's Wealth: Assessing and Improving Child Health*, Washington (DC), **2004**; 10.17226/10886.
208. Armstrong, K.H.A., H.C. The Bayley-III Cognitive Scale. In *Bayley-III Clinical Use and Interpretation*, Weiss, L.G.O., T.; Aylward, G.P., Ed. Academic Press: San Diego, **2010**; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374177-6.10002-9>pp. 29-45.
209. Nieto-Ruiz, A.; Garcia-Santos, J.A.; Bermudez, M.G.; Herrmann, F.; Dieguez, E.; Sepulveda-Valbuena, N.; Garcia, S.; Miranda, M.T.; De-Castellar, R.; Rodriguez-Palmero, M., et al. Cortical Visual Evoked Potentials and Growth in Infants Fed with Bioactive Compounds-Enriched Infant Formula: Results from COGNIS Randomized Clinical Trial. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11102456.
210. Koletzko, B.; Brands, B.; Poston, L.; Godfrey, K.; Demmelmair, H.; Early Nutrition, P. Early nutrition programming of long-term health. *Proc Nutr Soc* **2012**, *71*, 371-378, doi:10.1017/S0029665112000596.
211. Becker, C.G.; Artola, A.; Gerardy-Schahn, R.; Becker, T.; Welzl, H.; Schachner, M. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* **1996**, *45*, 143-152, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960715)45:2<143::AID-JNR6>3.0.CO;2-A .
212. Kuntz, S.; Kunz, C.; Borsch, C.; Vazquez, E.; Buck, R.; Reutzel, M.; Eckert, G.P.; Rudloff, S. Metabolic Fate and Distribution of 2 -Fucosyllactose: Direct Influence on Gut Microbial Activity but not on Brain. *Mol Nutr Food Res* **2019**, doi:10.1002/mnfr.201900035.
213. Marques, T.M.; Cryan, J.F.; Shanahan, F.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P.; Dinan, T.G.; Stanton, C. Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence the gut-brain axis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2014**, *22*, 239-247, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.10.016>.
214. Cerdó, T.; García-Valdés, L.; Altmäe, S.; Ruíz, A.; Suárez, A.; Campoy, C. Role of microbiota function during early life on child's neurodevelopment. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, *57*, 273-288, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.007>.
215. Coppa, G.V.; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Facinelli, B.; Ferrante, L.; Capretti, R.; Orazio, G. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: Escherichia coli,

## BIBLIOGRAFÍA

- Vibrio cholerae, and Salmonella fyris. *Pediatr Res* **2006**, *59*, 377-382, doi:10.1203/01.pdr.0000200805.45593.17.
216. Bindels, L.B.; Delzenne, N.M.; Cani, P.D.; Walter, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2015**, *12*, 303-310, doi:10.1038/nrgastro.2015.47.
217. Tarr, A.J.; Galley, J.D.; Fisher, S.E.; Chichlowski, M.; Berg, B.M.; Bailey, M.T. The prebiotics 3'Sialyllactose and 6'Sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: Evidence for effects on the gut-brain axis. *Brain Behav Immun* **2015**, *50*, 166-177, doi:10.1016/j.bbi.2015.06.025.
218. Cerdó, T.R., A.; Acuña, I.; Torres-Espínola, F.J.; Jáuregui, R; Suárez, A.; Campoy, C. Gut microbiota is associated with the infant cognitive development. In Proceedings of ESPGHAN Annual Meeting, Glasgow, Scotland, UK.



## *11. ABREVIATURAS*



## ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of variance
ARA	Arachidonic acid
BSDI-III	Escalas de Bayley de Desarrollo Infantil, Tercera Edición
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non- integrin
DFL	Di-fucosillactosa
DHA	Docosahexaenoic acid
DMB	5-(difluorometoxi)-2-mercapto-1H-bencimidazol
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DSLNT	Disialillacto-N-tetraosa
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
fEPSP	Excitatory postsynaptic potential
Fuc	Fucosa
FUT2	$\alpha$ 1-2-fucosyltransferasa
FUT3	$\alpha$ 1-3/4-fucosiltransferasa
2'-FL	2'-fucosillactosa
3'-FL	3'-fucosillactosa
Gal	Galactosa
Gal-T	$\beta$ 1-4-galactosiltransferasa
GBA	Gut-brain axis
GBS	Streptococcus del grupo B
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GOS	Galactoligoosacáridos
HFS	High-frequency stimulation
HMOs	Human milk oligosaccharides
HPLC	High performance liquid chromatography
Ig	Inmunoglobulina

## ABREVIATURAS

IL	Interleuquina
LCPUFAs	Long chain poly-unsaturated fatty acids
LNFPI	Lacto-N-Fucopentaosa I
LNnT	Lacto-N-tetraosa
LNT	Lacto-N-tetraosa
LPS	Lipopolisacárido
LTP	Long term potentiation
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MUFAs	Mono-unsaturated fatty acids
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NEC	Necrotizing Enterocolitis
Neu5Ac	Ácido N-Acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido N-glicolilneuramínico
NORT	Novel object recognition test
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cell
pIMC	Indice de masa corporal pre-concepcional
PN	Posnatal
PSA-NCAM	Polysialylated-NCAM
RFID	Radio frequency identification
RSV	Respiratory syncytial virus
3'-SL	3'-Sialillactosa
6'-SL	6'-Sialillactosa
SFAs	Saturated fatty acids
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
UDP-Gal	Uridin difosfato-galactosa
UHPLC-MS/MS	Ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer.
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>

## *12. ANEXOS*





## COMUNICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

---

### **48<sup>th</sup> ESPGHAN, Amsterdam, Netherlands, 2015**

Poster “Early supplementation with 2’-Fucosyllactose during lactation enhances memory and learning processes later in life in rats” **Oliveros, E.**; Martin, M.J.; Vazquez, E.; Barranco, A.; Ramirez, M.; Gruart, A.; Delgado-García, J.M.; Prieto, P.; Buck, R.; Rueda, R.

---

### **Solicitud enviada, 7<sup>th</sup> Nutrition & Growth, London, UK, 2020**

Poster “Human milk levels of 2’-fucosyllactose and 6’-sialyllactose are not impacted by maternal BMI or diabetic status and are positively associated with infant neurodevelopment” **Oliveros, E.**; Martin, M.J.; Torres-Espínola, F.J.; Segura-Moreno, M.T.; Ramírez, M.; Santos-Fandila, A.; Buck, R.; Rueda, R.; Escudero, M.; Catena, A.; Azaryah, H.; Campoy, C.

---

PATENTES ASOCIADAS

---

*The method of achieving memory and learning improvement by the administration of sialic acid.*  
Publication number: WO 2015/085077 A1. Martin, M.J.; **Oliveros, E.**; Barranco, A.; Ramirez, M.; Rueda, R.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)  
(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
11 June 2015 (11.06.2015)



(10) International Publication Number  
**WO 2015/085077 A1**

WIPO | PCT

---

*Methods for increasing brain functionality using 2-fucosyllactose.*  
Publication number: WO 2014/043368 A1. Vázquez, E.; Rueda, R.; Buck, R.; Ramirez, M.; Barranco, A.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)  
(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
20 March 2014 (20.03.2014)



(10) International Publication Number  
**WO 2014/043368 A1**

WIPO | PCT

---