



**Universidad
Europea**

**MÁSTER EN MICROBOTA, PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS
2020 – 2021**

TRABAJO FIN DE MÁSTER BIBLIOGRÁFICO

**USO DE OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA EN
FORMULACIONES INFANTILES Y POBLACIÓN ADULTA**

Alumno: Nelson Enrique Ramirez Rodriguez

Tutor: Alfonso Clemente Gimeno

Madrid - 2021

Contenido

Resumen	1
Abreviaciones	3
Introducción	7
1. Leche Humana	7
1.1. Composición	7
1.1.1. Macronutrientes y Micronutrientes	8
1.1.2. Factores Bioactivos	8
1.1.2.1. Factores de crecimiento	9
1.1.2.2. Factores Antioxidantes	9
1.1.2.3. Células	9
1.1.2.4. Factores inmunológicos	10
1.2. Influencia materna y del lactante en la composición de LH	10
2. Oligosacáridos de la leche humana HMO	12
2.1. Aspectos históricos de los HMO	12
2.2. Composición de los HMO	13
2.3. Aspectos bioquímicos de los HMO	14
2.4. Secreción de los HMO	14
2.5. Metabolismo de los HMO	16
2.6. Funciones de los HMO	18
2.6.1. Función prebiótica	18
2.6.2. Función antiadherente de microorganismos	20
2.6.3. Función inmunomoduladora	21
2.6.4. Función nutriente para el cerebro	22
2.6.5. Otras funciones de los HMO	23
3. Desarrollo biotecnológico de los HMO	24
3.1. Técnicas de producción de HMO “extramamaria”	24
3.1.1. Fábricas microbianas celulares	24
3.1.2. Síntesis química	26
3.1.3. Síntesis enzimática <i>in vitro</i>	27
4. Uso de HMO obtenidos de forma biotecnológica	29
5. Fórmulas lácteas infantiles suplementadas con HMO	29
5.1. Beneficios de las fórmulas infantiles suplementadas con HMO	30
5.1.1. Efectos sistémicos	30
5.1.1.1. Crecimiento y tolerancia a las fórmulas infantiles suplementadas con 2'-FL ...30	30

5.1.1.2.	Antiinfeccioso	31
5.1.1.3.	Inmunomodulador	32
5.1.1.4.	Desarrollo cerebral	33
5.1.2.	Efecto prebiótico	34
5.2.	Uso de HMO en formulaciones para adultos.....	35
5.2.1.	Modulación de la microbiota y barrera intestinal	36
5.2.2.	Enfermedades crónicas gastrointestinales	37
6.	Disponibilidad y regulación de productos disponibles con HMO.....	38
7.	Conclusiones	40
	Referencias.....	43

USO DE OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA EN FORMULACIONES INFANTILES Y POBLACIÓN ADULTA

Trabajo de Revisión de la Bibliografía
Trabajo de Fin de Máster en Microbiota, Probióticos y Prebióticos 2020 - 2021
Postulante: Nelson Enrique Ramirez Rodriguez
Tutor: Alfonso Clemente Gimeno

Resumen

La leche materna es un fluido dinámico que según la Organización Mundial para la Salud (OMS), es ideal para la nutrición y salud del recién nacido y del lactante. Está constituida por agua, macro y micronutrientes y varios factores bioactivos como, la lactoferrina, inmunoglobulinas, membrana del glóbulo de la grasa de leche (MFGM), oligosacáridos de la leche humana (HMO), ácidos grasos tales como el ácido araquidónico (ARA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), vesículas celulares como exosomas, microvesículas y bacterias probióticas, entre otros. Los HMO son un complejo soluble de glucanos y existen alrededor de 200, que son sintetizados en la glándula mamaria, con efectos bioactivos como agente prebiótico bifidogénico, antiinfeccioso, barrera epitelial; inmunomodulador, anticancerígeno y favoreciendo el neurodesarrollo del niño. En esta revisión se describen las diferentes formas de síntesis artificial de HMO, a través de métodos como biosíntesis bacteriana y de levaduras, síntesis química y enzimática *in vitro*. Los HMO más comúnmente sintetizados de manera artificial y suplementados en fórmulas infantiles y productos para adultos, con fines preventivos y terapéuticos son principalmente, la 2'-fucosillactosa y Lacto-N-neotetraosa y otros, aprobados para su uso al ser bien tolerados y seguros. Los estudios en modelos animales, *in vitro* y clínicos apuntan al efecto que se consigue en el consumo, en comparación de la leche materna, que nos plantean desafíos de investigación y oportunidades futuras.

Palabras clave: leche humana, HMO, oligosacáridos, fórmulas infantiles suplementadas, fórmulas para adultos, agentes bioactivos de la leche humana

Abstract

Breast milk is a dynamic fluid that, according to the World Health Organization (WHO), is ideal for newborn and infant's nutrition and health. It is made up of water, macro and micronutrients and various bioactive factors such as lactoferrin, immunoglobulins, milk fat globule membrane (MFGM), human milk oligosaccharides (HMOs), fatty acids such as arachidonic acid (ARA) and docosahexaenoic acid (DHA), cellular vesicles such as exosomes, microvesicles and probiotics, among others. HMOs are a soluble complex of glycans and there are about 200, which are synthesized in the mammary gland, with bioactive effects as a bifidogenic prebiotic agent, anti-infective, improvement of the epithelial barrier, immunomodulator, anticancer and they have a role in the child's neurodevelopment. This review describes the different forms of artificial synthesis of HMOs, through methods such as bacterial and yeast biosynthesis, chemical and enzymatic synthesis *in vitro*. The HMOs most synthesized by biotechnology and used in infant formulas and adult products for preventive and therapeutic purposes are 2'-fucosyllactose and Lacto-N-neotetraose and others, approved for its use as they are well tolerated and safe. Studies in animal, *in vitro* and clinical models point out to the functional effect achieved with the consumption, compared to those obtained from breast milk, which offers future challenges and opportunities.

Keywords: human milk, HMO, oligosaccharides, supplemented infant formulas, adult formulas, bioactive factors in human milk

Abreviaciones

2`FL 2`-Fucosillactosa

3`FL 3`-Fucosillactosa

3`-SL 3`-Sialillactosa

6`-SL 6`-Sialillactosa

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AGCL Ácidos Grasos de Cadena Larga

ARA Ácido Araquidónico

ARNr Ácido Ribonucleico Ribosomal

ATP Adenosin Trifosfato

BDNF Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

CAZy Carbohydrate-Active enZymes

CD Cluster Differentiation

CFG Functional Glycomics Gateway

CNTF Factor Neurotrófico Ciliar

"DFL o LDFT Difucosillactosa

DHA Ácido Docosahexanoico

DSLNT Disialillacto-N-tetraosa

ECN Enterocolitis necrosante

EFSA Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EGF Factor epidérmico de crecimiento

FDA Food and Drug Administration

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU.

FDS-LNH-I Fucosildiasillacto-N-hexaosa I

FOS Fructo - oligosacáridos

FUC L - Fucosa

FUT Fucosiltransferasa

G- CSF Factor estimulante de la colonización de los granulocitos

GAL D - Galactosa

GDNF Factor neurotrófico derivado de células gliales

GDP Guanosin Difosfato

GH Glucósido Hidrolasa

GL Galactosillactosa

GT Glucosiltransferasa

GOS Galacto - oligosacaridos

GRAS Generalmente Reconocido como Seguro

HB - EGF Factor Heparina unido al Factor de crecimiento epidérmico

HEp -2 Human Epidermoid Cancer Cells

HMOs Oligosacáridos de la Leche Humana

IFN γ Interferon Gamma

Ig	Inmunoglobulinas
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleucinas
ISAPP	Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos
LDFT	Lactodifucotetraosa
LE / FUT - 3	Gen de Lewis
LH	Leche Humana
LNB	Lacto-N-Biosa
LNDFH	Lacto-N-difucohexaosa
"LNDFH-I o DFLNT	Lacto-N-difucohexaosa I
LNFP	Lacto-N-fucopentaosa
LNFP-I	Lacto-N-fucopentosa I
LNFP-II	Lacto-N-fucopentosa II
LNFP-III	Lacto-N-fucopentosa III
LNnT	Lacto-N-neotetraosa
LNT	Lacto-N-tetraosa
LPS	Lipopolisacáridos
LSTc	Sialillacto-N-neotetraosa
MFGM	Membrana del Glóbulo de la Grasa de la Leche
MIF	Factor inhibidor de la migración de los macrófagos

NK Células Asesinas Naturales

OMS Organización Mundial de la Salud

Se / FUT - 2 Gen Secretor

SHIME® Simulador del Ecosistema Microbiano Intestinal Humano

SL Sialilactosa

SL - HMO Oligosacáridos de la Leche Humana Sialilados

SNC Sistema Nervioso Central

T reg Linfocitos T Reguladores

TF-LNH Trifucosillacto-N-hexaosa

TG Triglicéridos

TGF β Factor de Crecimiento Transformador Beta

Th Linfocitos T Colaboradores

TLR Toll Like Receptors

TNFR Inhibidor del Factor de Necrosis Tumoral

TNF α Factor de Necrosis Tumoral Alfa

VEGF Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

VEGFRs Receptores de Factores de Crecimiento Vascular Endotelial

VIH Virus de Inmunodeficiencia Humana

β 1-4GalT1 β -1-4-galactosiltransferasa 1

Introducción

Según la carta de posicionamiento de la Organización Mundial para la Salud (OMS) sobre la lactancia materna, la leche humana es el alimento ideal y está indicada de manera exclusiva para el recién nacido y el lactante, los primeros 6 meses de vida y debe ser mantenida hasta los dos años (*wbw-2020-joint-letter---unicef-who.pdf*, s. f.). La leche humana proporciona componentes nutricionales (macronutrientes y micronutrientes) y otros componentes bioactivos funcionales que son importantes para el crecimiento adecuado de un niño sano. Esta revisión está enfocada en la síntesis de los oligosacáridos de la leche humana HMOs (del inglés *Human Milk Oligosaccharides*) y su uso en formulaciones infantiles y de adultos. En particular se describirá primero la forma natural de su síntesis de HMO en la glándula mamaria, y su funcionalidad sobre el lactante. Por otro lado, también se detalla las características de los HMO sintetizados de forma biotecnológica y sus características funcionales al ser suplementados a través de fórmulas infantiles y otras formulaciones para adultos, enfocando las perspectivas futuras de beneficio para la salud del ser humano, bajo la regulación vigente.

1. Leche Humana

La leche humana (LH) se considera que es un fluido dinámico, funcional que contiene sustancias nutricionales (macronutrientes y micronutrientes) y no nutricionales (bioactivos).

1.1. Composición

La composición de la leche humana es variable al ser un líquido dinámico, puesto que dependiendo del día y el tiempo de lactancia tiene diferencias en su composición. De manera general, está constituida por agua (88%), electrolitos, macronutrientes como son las proteínas, grasas y carbohidratos, micronutrientes como vitaminas, minerales y elementos traza y sustancias bioactivas.

1.1.1. Macronutrientes y Micronutrientes

En relación al componente proteico de la LH, en un análisis longitudinal de la composición de LH en prematuros y recién nacidos a término (Fischer Fumeaux et al., 2019), se encontró que el contenido total de proteína gradualmente disminuye desde el nacimiento hasta los 4 meses en un promedio de 2,2 g/dL hasta 1,5 g/dL en leche para prematuros y desde 2,5 g/dL a 1,7/dL en leche madura para recién nacidos a término. En relación a la grasa total, los valores promedio en LH para prematuros fue de 2,8 g/dL y LH para recién nacidos a término 2,1 g/dL. Con respecto a los carbohidratos, éstos están representados principalmente por la lactosa y no se encontró diferencia importante entre la producción para prematuros y para los de término en el nacimiento, pero se encontraron diferencias en la séptima semana de vida, 6,1 g/dL versus 5,6 g/dL, respectivamente. En el caso de la densidad energética, se observó una tendencia a ser mayor en LH de prematuros (58,7 Cal/dL) versus LH de recién nacidos a término (53,1 Cal/dL).

Los micronutrientes que contiene la LH, fueron inicialmente clasificados como Tipo I, por ejemplo: calcio, tiamina, riboflavina y vitamina B 12) y Tipo II: aminoácidos esenciales, zinc, potasio, selenio y fósforo entre otros. En la actualidad, el papel que juegan los micronutrientes en el crecimiento del lactante se encuentra aún en estudio, en especial los del Tipo II (Eriksen et al., 2018).

1.1.2. Factores Bioactivos

Desde hace tiempo se conoce que la leche humana además de sus componentes nutricionales tiene elementos bioactivos que afectan a numerosos procesos fisiológicos que causan un impacto en la función o condición corporal y finalmente en su salud (Tabla 1). Estos factores son producidos a diferentes niveles, como el epitelio mamario, células transportadas a la leche, otros

proviene del suero de la madre y la membrana del glóbulo de la grasa de la leche MFGM (*Milk Fat Globule Membrane*) ingresa a la leche desde el epitelio mamario, unido a proteínas. De manera general se dividen en factores de crecimiento y factores inmunológicos (Ballard & Morrow, 2013), (Gila-Diaz et al., 2019), (Mazzocchi et al., 2019).

Los principales factores bioactivos de la leche humana son:

1.1.2.1. Factores de crecimiento

- Factor epidérmico del crecimiento (EGF)
- Factor heparínico ligado al factor de crecimiento epidérmico (HB-EGF)
- Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)
- Factor de crecimiento parecido a la insulina familiar (IGF)
- Factores de crecimiento neuronal
 - factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)
 - factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF)
 - factor neurotrófico ciliar (CNTF)
- Eritropoyetina
- Calcitonina y somatostatina
- Hormonas
 - Adiponectina, leptina, resistina, grelina, obestatina, nesfatina, apelina

1.1.2.2. Factores Antioxidantes

- α -caroteno, β -caroteno, licopeno, retinol, α -tocoferol y γ -tocoferol

1.1.2.3. Células

- Macrófagos
- Células madre

1.1.2.4. Factores inmunológicos

- Inmunoglobulinas (IgA/IgA secretora, IgG, IgM)
- Citocinas: interleucinas (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10), interferón gamma (IFN γ), factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)
- Quimocinas: factor estimulante de la colonización de los granulocitos (G-CSF), factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF)
- Inhibidores de las citocinas: receptores I y II del factor de necrosis tumoral (TNFR I y II)

Además de los mencionados existen otros factores bioactivos como taurina, folatos, poliaminas, ferritina, MFGM, prebióticos como los HMO, microbiota, entre otros. En la Tabla 1, se describen los componentes bioactivos más importantes y sus funciones relacionadas, (Demmelmair & Koletzko, 2018) (Carr et al., 2021).

1.2. Influencia materna y del lactante en la composición de LH

Su composición puede estar influenciada por factores maternos y del lactante (Samuel et al., 2020). Dentro de los factores maternos está la dieta que tiene impacto en el volumen de producción, pero también en el contenido de macronutrientes como la concentración grasa no encontrándose diferencias en el aporte calórico en mujeres con dietas menores de 1200 Cal/día. Cuando la madre recibe suplementación de micronutrientes como iodo, selenio y hierro mejoran sus concentraciones en la leche, pero en relación con la suplementación del zinc, aún los resultados son inconsistentes. No se han observado cambios en la concentración de calcio en la leche con relación a la dieta materna. En el caso de las vitaminas del complejo B, se ha apuntado que una buena dieta o suplementación aseguran concentraciones aceptables. Existe evidencia limitada sobre los efectos de la suplementación de vitamina E, pero si hay evidencia

científica sobre los niveles de vitamina A y D adecuados cuando existe suplementación. Otros elementos que pueden afectar a la producción de leche humana dependiente de la madre son las características antropométricas, número de parto, tipo de nacimiento, estado socioeconómico, estado de salud y uso de galactogogos, todos estos con evidencia insuficiente. Por otro lado, los factores con evidencia probable que pueden afectar los componente nutritivos y no nutritivos de la leche humana dependiente del lactante son: peso al nacimiento, edad gestacional, edad (en el estado,

Tabla 1. Funciones de factores bioactivos de la leche humana

COMPONENTE BIOACTIVO	FUNCIÓN
Lactoferrina (glucoproteína) <ul style="list-style-type: none"> • Calostro = 3,16 g/L • Leche madura = 1,73 g/L 	Libera neutrófilos, mejora actividad de células NK Antibacteriano, antiviral, antifúngico, anti-inflamatorio, anti-cancerígeno. Limitante de disponibilidad de hierro por microbios Favorece el crecimiento Previene en neonatos Enterocolitis Necrosante (ECN)
Inmunoglobulinas <ul style="list-style-type: none"> • Mayor concentración de IgAs • Menor concentración de IgG Depende del estado de salud materna (depresión, ansiedad, estrés, diabetes)	IgAs protege contra toxinas, bacterias y virus, previene la unión al huésped o directamente neutralizando. Sirve de primera línea de defensa intestinal, antiinflamatoria; IgG antibacteriano; IgE previene alergias; IgM antiviral (Parvovirus B19, disminuye progreso de VIH)
Oligosacáridos de Leche Humana (HMOs) (estructuras de carbohidratos no conjugados a base de lactosa) 7 - 14 g / L de leche materna madura 20 - 24 g / L en el calostro	Promueve buen crecimiento de microbiota intestinal y efecto anti-infeccioso: Prebióticos (promueve crecimiento de <i>B. infantis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> y <i>Bacteroides vulgatus</i>) <i>Lactobacillus</i> . Madurez intestinal (IgAs, IgG). Efectos antimicrobianos (<i>S. aureus</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>S. agalactie</i>). Antiviral (Rotavirus, Norovirus, VIH, Influenza) Mejora efecto barrera del intestino y función inmune: disminuyen la expresión de citocinas proinflamatorias, penetración bacteriana patógena y permeabilidad intestinal, antiinflamatorio. Prevención de ECN.
Membrana del glóbulo de la grasa de la leche (MFGM) Gotas de grasa (3 – 6 µm diámetro) envueltos en 3 capas de fosfolípidos. En su interior proteínas, lípidos y carbohidratos. El núcleo está compuesto por TG y AGCL (DHA y ARA)	Forma parte de los fosfolípidos y esfingolípidos: promoción de neurogénesis y migración cerebral durante el desarrollo fetal; estimulación del crecimiento neuronal, diferenciación y sinaptogénesis en el primer año de vida. Gangliosidos: desarrollo del intestino, sistema inmunitario y SNC. Desarrollo corporal y prevención de infecciones
Ácidos Grasos Promedio de niveles en leche humana <ul style="list-style-type: none"> • DHA (ácido docosahexanoico 22:6n-3) = 0,32% (del total de ácidos grasos) • ARA (ácido araquidónico 20:4n-6) = 0,47 % Depende de la suplementación en la dieta materna	Desarrollo cerebral, favorable para desarrollo neuro-cognitivo (mielinización) Aadyuvante del sistema inmune Desarrollo de la visión
Probióticos: la microbiota de la leche humana está en relación a la circulación entero mamaria. Microbiota materna es parte del eje intestino – mama Microbiota de la leche humana <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> spp, <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Enterococcus</i>	Las bacterias promueven el desarrollo de células B en placas de Peyer. Incrementa la secreción de IgA (primera línea de defensa) Mejora la actividad contra infecciones por inducción de la maduración de células citotóxicas Th1 <i>Lactobacillus</i> en leche humana, promueve liberación de citoquinas de Th1 y TNF alfa y activa células NK, CD4+, CD8+ y Treg Mayor abundancia y riqueza de bifidobacterias Menor abundancia de <i>Clostridioides difficile</i> Mejora la tolerabilidad a alimentos
Vesículas extracelulares: Exosomas (30-100 nm) y microvesículas (100-1000 nm) compuestos por proteínas, microARN y metabolitos	Mejora microbiota Efecto antiinfeccioso (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , influenza)

Células asesinas naturales NK; Enterocolitis necrosante ECN; Inmunoglobulina A IgA; Inmunoglobulina G IgG; Inmunoglobulina M IgM; Virus de Inmunodeficiencia humana VIH; Triglicéridos TG; Ácidos grasos de cadena larga AGCL; Ácido docosahexanoico DHA; Ácido araquidónico ARA; Sistema Nervioso Central SNC; Oligosacáridos de la leche humana HMOs; Linfocitos ayudadores tipo 1 Th1; Factor de necrosis tumoral alfa TNFalfa; Linfocitos colaboradores T CD4; Linfocitos T citotóxicos CD8; Linfocitos reguladores Treg

de lactancia), sesión y variabilidad circadiana, mientras que la evidencia es inconsistente o nula en el tiempo de lactancia, variación entre senos y el sexo de lactante.

2. Oligosacáridos de la leche humana HMO

Del total de la composición sólida de la leche humana, aproximadamente el 7% corresponde a los carbohidratos, siendo la lactosa (Gal β 1-4Glc) la de mayor concentración (60g/L). En la actualidad existe evidencia emergente de las funciones de estos carbohidratos, en particular de oligosacáridos, con efectos sobre el crecimiento y la salud de los lactantes. La concentración de carbohidratos depende de factores maternos, como la dieta (por ejemplo el consumo elevado de azúcar, repercute sobre la concentración de fructosa) y estado de salud (obesidad o diabetes) (P. K. Berger et al., 2020).

2.1. Aspectos históricos de los HMO

Alrededor del año 1900, se hicieron observaciones en la diferencia de la composición de las heces de lactantes alimentados con leche materna, en las que se encontraron abundancia de lactobacilos y bifidobacterias, versus las heces de los que recibían fórmula láctea, que no tenían esta característica. Esta observación se asoció a la fracción de carbohidratos de la leche humana. De 1950 a 1980 se identificaron HMO individuales y se realizaron estudios de sus funciones (bifidogénica, anti-adhesivas y antiinflamatorias). En este lapso de tiempo, también se encontró que la 2'-Fucosillactosa, no era detectable en muestras de leche de mujeres no secretoras, en las que la expresión de epítomos del grupo sanguíneo ABO en sus eritrocitos, correspondían a su fondo genético ABO y no se expresaban en la glucoproteínas secretadas por las células epiteliales productoras de moco de la glándulas (Kunz, 2012).

2.2. Composición de los HMO

Los HMO, constituyen el tercer elemento de mayor concentración en la leche humana después de las grasas y la lactosa (7 – 14 g/L en leche madura y 20 – 24 g/L en calostro) con valores promedio de 5-15 g/L. Se han identificado más de mil oligosacáridos y alrededor de más de 160 han sido definidos estructuralmente. En la actualidad, aún no se tienen establecidos métodos estandarizados para el análisis de rutina de los HMO, lo que conlleva a una discrepancia entre los datos obtenidos cuantitativos y cualitativos publicados. Los HMO son un complejo soluble de glucanos que contienen una combinación diferente de monosacáridos. Los HMO, contienen lactosa (Gal β 1-4Glc) en el extremo reductor de la molécula, unido a diferentes combinaciones de monosacáridos; D-galactosa (Gal), N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc) y el ácido siálico N-acetilneuramínico (Neu5Ac) (Kunz & Rudloff, 2017). Los HMO se clasifican en

- Fucosilados o neutros, contienen fucosa en su posición terminal.
Ejemplos: 2'-Fucosillactosa (2'-FL) y Lactodifucopentosa
- No fucosilados o neutros N-contenedores: contienen N-acetilglucosamina en su extremo terminal. Ejemplo: Lacto-N-tetraosa
- Acídicos o sialilados: contienen ácido siálico en la terminación. Ejemplo: 2'-Sialillactosa

Se ha encontrado que de manera general, en la leche humana a término, existe una proporción de 35 – 50% de HMO fucosilados, 12 – 14% de HMO sialilados y 42 – 55% de HMO no fucosilados neutros (Ray et al., 2019).

2.3. Aspectos bioquímicos de los HMO

Los oligosacáridos de la leche humana pueden ser representados por abreviaciones y gráficos CFG (*Consortium of Functional Glycomics*), utilizando los siguientes símbolos estandarizados:

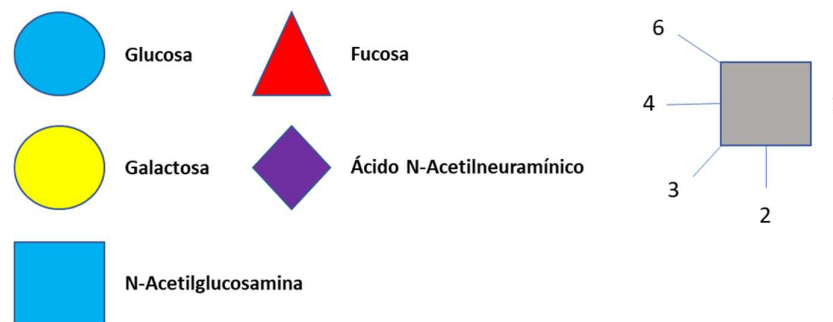


Fig. 1 Representaciones esquemáticas de la estructura de HMO (Soyyilmaz et al., 2021)

Si bien se han estudiado más de 160 HMO, los 15 más abundantes en la leche humana madura se describen en la Tabla 2. Todos ellos incluyen a la lactosa como núcleo, a la que se pueden unir unidades del disacárido galactosa-N acetilglucosamina y/o modificada por residuos de ácido siálico y/o fucosa. Dado que la estructura de un HMO determina su función, la abundancia relativa de estructuras individuales puede dar forma al efecto resultante de una mezcla compleja de HMO.

2.4. Secreción de los HMO

La concentración de HMO en la leche varía según cada individuo y el tiempo de la lactancia. Las concentraciones elevadas en el calostro van disminuyendo en la leche madura. La concentración y composición también varía entre madres, inclusive antes del parto. Así, en un estudio piloto reciente, se encontraron hasta 16 oligosacáridos en plasma de mujeres con 35 semanas de gestación. Es conocido que los patrones de HMO, dependen del fondo genético, en el grupo sanguíneo de Lewis y el estado secretor de la madre (Jantscher-Krenn et al., 2019).

Tabla 2. Principales oligosacáridos de la leche humana

Abreviación	Nombre	Estructura
HMO neutros		
LNT	Lacto-N-tetraosa	
LNnT	Lacto-N-neotetraosa	
2'FL	2'-Fucosillactosa	
3'FL	3'-Fucosillactosa	
DFL (LDFT)	Difucosillactosa	
LNDFH-I (DFLNT)	Lacto-N-difucohexaosa I	
LNFP-I	Lacto-N-fucopentosa I	
LNFP-II	Lacto-N-fucopentosa II	
LNFP-III	Lacto-N-fucopentosa III	
TF-LNH	Trifucosillacto-N-hexaosa	
HMO ácidos no-fucosilados		
3'-SL	3'-Sialillactosa	
6'-SL	6'-Sialillactosa	
DSLNT	Disialillacto-N-tetraosa	
LSTc	Sialillacto-N-neotetraosa	
HMO ácidos fucosilados		
FDS-LNH-I	Fucosildiasillacto-N-hexaosa I	

Adaptado de (Urashima et al., 2018)

Dependiendo de estos parámetros las características de la leche humana determinarán la reducción o riesgo de ciertas enfermedades. Según los grupos sanguíneos de Lewis, se han identificado cuatro grupos de leche humana (Stahl et al., 2001). Como la lactosa es el sustrato inicial para la biosíntesis de HMOs y se forma en el aparato de Golgi por acción de la lactosa sintetasa, se piensa de manera análoga, que también estaría relacionado con la síntesis de los HMO neutros.

La leche humana, contiene una gran diversidad de oligosacáridos complejos y altas concentraciones de 2'-FL, que está sujeto a variación interindividual del

grupo de antígeno del sistema sanguíneo de Lewis de la madre, éste engloba dos genes: el gen de Lewis (gen LE o gen FUT-3) que la define como no secretora (Se-), el gen (gen Se o gen FUT-2) o secretora (Se+) y Lewis positiva (Le+) o Lewis negativa (Le-). Tanto los genes secretores y de Lewis, son responsables de producir fucosiltransferasa-2 (FUT-2) y fucosiltransferasa-3 (FUT-3), respectivamente, como se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Presencia de HMO según grupo de Lewis y genotipo secretor

Grupo sanguíneo	Porcentaje de la población	Genotipo	HMO	Grupo de leche
Lewis b	69%	Secretora	2'FL, LDFT, LNFP II	1
Lewis a	20%	No secretora	LNFP II, LNDFH II	2
Lewis 0	9%	Secretora	2'FL, LDFT, LNFP I	3
Lewis 0	1%	No secretora	-	4

2'FL, 2'-fucosillactosa; LDFT, lactodifucotetraosa; LNFP, lacto-N-fucopentaosa; LNDFH, lacto-N-difucohexaosa.

2.5. Metabolismo de los HMO

La biosíntesis de los HMO en la glándula mamaria aún está poco comprendida. La mayoría de los HMO tienen un núcleo de lactosa con terminaciones no reducidas, que se creen son catalizadas por glucosiltransferasas en la glándula mamaria. La glucosa y galactosa pueden ser sintetizadas *de novo* en la glándula por un proceso de hexoneogénesis, considerando que la glucosa plasmática es la mayor fuente de carbón de la lactosa de la leche. La lactosa y otros oligosacáridos de la leche se acumulan en la vesícula secretora y es secretada por fusión exocitótica con la membrana plasmática apical. La lactosa es producida en la glándula mamaria por la β -1-4-galactosiltransferasa 1 (β 1-4GalT1) unida a la α -lactoalbúmina en un complejo lactosa sintetasa. Sin embargo la mayoría de las glicosiltransferasas, que son responsables de la formación de los HMO, no han sido aún identificadas (Chen, 2015).

A pesar de los recientes avances en un estudio de estructura química y funcionalidad de los HMO y debido a la gran diversidad estructural de los mismos, es difícil determinar, cuáles son las estructuras más importantes para la salud de los lactantes.

Existe gran interés por parte de la comunidad científica en establecer un vínculo directo entre las estructuras de HMO y su función prebiótica *in vivo*, en los lactantes. Se ha descrito una asociación entre la composición fecal y la microbiota intestinal de lactantes amamantados con leche humana. Los datos actuales han llevado a la conclusión que la mayor parte de los HMO, llegan al tracto gastrointestinal inferior, donde podrían ser utilizados como factores nutritivos por varios microorganismos o influir en sus actividades. El resto se excreta intacto o en forma metabolizada en heces u orina, lo que indica que no existe un proceso metabólico uniforme para todos los HMO (Kunz & Rudloff, 2017).

Los estudios de metabolismo pueden ayudar a identificar si los HMO son absorbidos por el organismo del lactante. En estudios en ratas adultas, se detectó que tras la administración de 2'-FL y 6'-sialillactosa y lacto-N-neotetraosa, la presencia de estas sustancias en la circulación sanguínea, así como en la orina, demostrándose que existe una pequeña cantidad de HMO absorbido y excretado (Vazquez et al., 2017). Por el contrario, en casos de ratas recién nacidas a las cuales también se administró un pulso de HMO de 15 mg/mL, se encontró que no existe degradación de estos azúcares y que llegan intactos a segmentos distales de intestino. (Jantscher-Krenn et al., 2013). Estos modelos animales han contribuido a un mayor entendimiento del metabolismo de HMO en lactantes.

En la actualidad existe evidencia que los oligosacáridos de la leche humana se encuentran presentes en la circulación sanguínea de los lactantes amamantados con ésta. En un estudio realizado en dos grupos de lactantes sanos, se administró al primero una fórmula infantil estándar y al segundo, leche materna. Utilizando pruebas de cromatografía y espectrometría de masas, se analizó la presencia de oligosacáridos en plasma y orina. Los resultados mostraron que en los niños que tomaron leche humana

se identificaron niveles de 2'-FL, 3'-FL y LNnT, tanto en plasma ($r=0,98$, $p<0,001$; $r=0,75$, $p=0,002$; $r=0,71$, $p=0,004$), como en orina ($r=0,81$, $p<0,001$; $r=0,56$, $p=0,026$; NS) y no se encontraron éstos en el grupo control. Dentro del grupo que recibió lactancia materna hubo diferencia en los niveles de HMO fucosilados, entre secretores y no secretores (Goehring et al., 2014).

2.6. Funciones de los HMO

Los oligosacáridos de la leche humana han sido estudiados desde el siglo pasado, englobados dentro de las sustancias bioactivas, que benefician al lactante desde el nacimiento. En el neonato tienen la función de protegerlo de infecciones, facilitar el establecimiento de la microbiota, promueve el desarrollo intestinal y estimula la maduración inmune (Donovan & Comstock, 2016).

En lactantes, la evidencia, ha permitido diferenciar a sus funciones en cuatro grandes grupos:

- Función prebiótica (modeladora de la microbiota)
- Función antiadherente de microorganismos
- Función inmunomoduladora
- Función nutriente para el cerebro

2.6.1. Función prebiótica

La microbiota del niño se establece en los primeros mil días de vida, este es un proceso que comienza desde el nacimiento donde interfieren inclusive factores prenatales, siendo aun cuestionado el hecho que haya colonización intrauterina. La colonización del recién nacido comienza al momento del nacimiento, que puede ser por vía vaginal (microbiota materna) o por cesárea (microbiota nosocomial).

El concepto de prebiótico, acuñado en 1995, se refiere a “*ingredientes no digeribles de la dieta*”, que tienen efectos beneficiosos sobre el huésped y desde 2017 según la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP en inglés), se define como “*sustrato que es selectivamente utilizado por los microorganismos del huésped, confiriéndole un beneficio para su salud*” (Gibson et al., 2017). Los prebióticos deben ser resistentes al ácido gástrico, hidrólisis enzimática y absorción intestinal para ser posteriormente fermentados por la microbiota intestinal. Los HMO cumplen estos criterios.

Los HMO, sirven como sustrato metabólico para el crecimiento de microorganismos beneficiosos en el intestino del lactante. El género predominante es *Bifidobacterium*, y favorecido por la presencia de este agente bifidogénico. Los HMO son fermentados en el colon por las bifidobacterias y como productos principales de fermentación, encontramos a los ácidos grasos (acético y láctico), que producen disminución del pH intestinal, inhibiendo el crecimiento de patógenos. Se producen también otros ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como el butírico y propiónico, siendo el primero, la principal fuente de energía para los colonocitos. La capacidad de las bifidobacterias (*B. infantis* y *B. bifidum*) depende de la vía metabólica (intracelular y extracelular), que involucra traslocación de oligosacáridos intactos al medio intracelular, utilizando transportadores. *Bifidobacterium longum* subespecie *infantis*, es considerado “el campeón de la colonización del intestino del lactante” (Underwood et al., 2015), por el efecto que tienen los HMO sobre su abundancia. Los HMO, son degradados por varias glicosil hidrolasas y liberadas en forma de monosacáridos, que al

ser fermentados generan ATPs, lactato y acetato, como productos finales (Moubareck, 2021). Esta microbiota enriquecida en bifidobacterias juega un importante papel en el desarrollo y maduración del sistema inmune del lactante. La práctica de nacimientos por cesárea y uso de antibióticos han quebrantado la transferencia de *B. infantis* de la madre, al nacimiento, llevando a la pérdida de este miembro clave en la microbiota intestinal, la cual resulta en un incremento del pH de las heces de los lactantes (Chichlowski et al., 2020).

2.6.2. Función antiadherente de microorganismos

Existe evidencia científica sobre el papel que juegan los HMO antiadherentes microbianos, sirviendo como receptores señuelo solubles, previenen la adherencia de patógenos a las superficies de las mucosas de los lactantes y reducen el riesgo infeccioso de virus, bacterias y protozoos. La adherencia de patógenos produce mediante interacciones lectina-glucanos, tal como ocurre con *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*, ambos a través de las fimbrias. *Campylobacter jejuni* se une vía antígenos-H tipo 2, que es bloqueado por los α 1-2 HMO fucosilados (Bode, 2012). Mediante estudios *in vitro*, se ha observado que cinco HMO (2'-fucosillactosa, lacto-N-tetraosa, lacto-N-fucopentosa I, lacto-N-fucopentosa II y lacto-N-fucopentosa III), son ligandos para toxinas bacterianas de *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* patógena, holotoxina de la toxina Shiga tipo 2 y los homopentámeros de la subunidad B de la toxina del cólera, la toxina termolábil y la toxina Shiga tipo 1, como a las toxinas A y B de *Clostridiodes difficile* (El-Hawiet et al., 2015).

En relación a virus y parásitos, los HMO dificultan la adherencia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y *Entamoeba histolytica*. De la misma forma también ejercen efecto de barrera en la mucosa intestinal en el epitelio intestinal donde se observó que existe una regulación negativa de las células CD14. Estas son co-receptores para los lipopolisacáridos (LPS) e involucran a la señalización de los *toll like receptors 4* (TLR-4), que puede dar lugar a la disminución de la respuesta inflamatoria intestinal, tras la exposición a LPS.

2.6.3. Función inmunomoduladora

Existen estudios cuyos resultados muestran que los HMO acídicos inducen a que el interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 10 (IL-10) en células T de sangre de cordón pueden disminuir la producción de las IL-4 en células T alérgico-específicas, pudiendo tener relación con la disminución de la respuesta Th2 en lactantes. También se ha indicado que la suplementación de 2'-FL puede disminuir los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-1 α , IL-1 β y IL-6 así como sucede en niños amamantados con leche humana. Los LNFP III y LNnT mostraron que tienen efectos inmunosupresores; LNFPIII puede inducir a IL-10 en macrófagos; los HMO tienen una función antialérgica/antiinflamatoria. Se ha descrito que LNFPIII está ligado a efectos como hepatoesteatosis y resistencia insulínica, encontrándose en estudios animales que tiene efectos protectores para desarrollar Diabetes tipo 1 (Triantis et al., 2018). Pero además de tener efectos antiinfecciosos y antiinflamatorios, los HMO han mostrado ser potencialmente útiles en la tolerancia oral y el desarrollo de alergias. En un estudio de cohorte, publicado recientemente se muestra que la exposición a

altos niveles de HMO de clase Lewis ácidos, se relacionan con un mayor riesgo de eczema y alergia respiratoria en comparación con niños expuestos a HMOs neutrales. También hay estudios que relacionan niveles bajos de 6'-L, LNFP I, LNFP II y DSLNT en leche materna con alergia a la proteína de la leche de vaca en lactantes, pero aún faltan estudios homogéneos y aleatorizados para tener una mayor evidencia científica (Lodge et al., 2021).

2.6.4. Función nutriente para el cerebro

Estudios llevados a cabo con animales y en niños alimentados con leche humana, sugieren que tras la absorción de los HMO sialilados, éstos son utilizados como fuente de ácido siálico, sustrato para la biosíntesis de componentes como gangliósidos y glucoproteínas para el cerebro, De este modo, se ha especulado que durante el periodo neonatal la producción *de novo* de ácido siálico es insuficiente para alcanzar las necesidades de todos los tejidos que crecen rápidamente y que el ácido siálico proveniente de los HMO, sirve como un nutriente condicionante esencial para el neonato que se amamanta, aunque todavía se desconoce cuáles son los HMO específicos para esta función (Rudloff & Kunz, 2012). Por otro lado, esta capacidad de nutrir al cerebro, junto a otros componentes bioactivos de la leche humana como los MFGM (ricos en fosfolípidos), los ácidos grasos de cadena larga, vitaminas (A, B, C, D, K), ácido siálico (tanto en forma libre como unido a oligosacáridos, gluproteínas y glucolípidos) y otros componentes bioactivos, afectan al neurodesarrollo del lactante. En este sentido los HMO, se han convertido en el centro de atención de la investigación cognitiva, debido a sus efectos generalizados sobre el desarrollo y la inteligencia infantil. Se han identificado a tres familias principales de HMO: neutros no fucosilados (ej.

LNnT), los fucosilados (ej. 2'-FL) y los sialilados o acídicos no fucosilados (e, 3'-SLy 6'-SL). Como ya se mencionó dependiendo de la mujer si tiene genes secretores o no, y cuál tipo de enzimas FUT están activas, se pueden sintetizar diferentes oligosacáridos como en el caso de la expresión de FUT-2, que resulta en la síntesis de 2'-FL, mientras la expresión de FUT-3 se asocia con la formación de LNFP II. De manera general la leche de “mujeres secretoras”, contiene mayor concentración de HMO. Este conocimiento ha llevado a que se desarrollen estudios del impacto sobre el estado cognitivo y registros electrofisiológicos cerebrales, de animales (roedores y cerdos) en edad temprana que recibieron oligosacáridos sialilados y fucosilados, encontrando un mejor desempeño intelectual en éstos, en relación a animales, que no lo recibieron. Si bien son varios los factores que afectan en el desarrollo cognitivo del niño, se considera que este tipo de HMO, puede ser un factor importante para este beneficio (Docq et al., 2020).

2.6.5. Otras funciones de los HMO

Ciertos HMO tienen efectos sobre la angiogénesis, tal es el caso, LNnT, que a través de la respuesta Th2, promueve efectos angiogénicos que han resultado en un modelo de cicatrización de heridas en piel, mientras que otros HMO sialilados como 3'-SL y 6'-SL inhiben la angiogénesis con efectos beneficiosos contra el cáncer, hiperplasia de próstata benigna y retinopatía del prematuro. Este efecto se consigue a través de la supresión de la angiogénesis del receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFRs 2) (Bae et al., 2021).

3. Desarrollo biotecnológico de los HMO

Los beneficios funcionales y nutricionales, que recibe el neonato y lactante, tras la ingesta de los HMO, ha despertado el interés científico de poder utilizarlo como componente bioactivo suplementado, aplicado a las fórmulas infantiles y actualmente también a las formulaciones dirigidas a adultos. Los HMO están presentes en la leche humana en promedio de 5-15 g/L. De los casi 200 HMO encontrados en la leche humana, cinco monosacáridos y 10 diferentes tipos de enlaces constituyen la plétora completa de su estructura y han sido identificadas por la industria para poder sintetizarlos de manera artificial. La demanda actual no puede ser cubierta por otros métodos “naturales” de administración de HMO, como es el caso de los bancos de leche, justificando la necesidad de tener alternativas de manera “extramamaria”.

3.1. Técnicas de producción de HMO “extramamaria”

La producción biotecnológica de oligosacáridos de la leche humana, es el resultado de la necesidad de cubrir la demanda de sustancias bioactivas que mimeticen efectos beneficiosos. La leche humana es considerada el estándar de oro. Los oligosacáridos de origen animal (vaca, cabra, oveja), difieren cualitativa y cuantitativamente de los HMO, no pudiendo ser alternativa a los mismos en nutrición infantil y para adultos. Fórmulas infantiles, han sido suplementadas por fructo-oligosacáridos (FOS) y/o galacto-oligosacáridos (GOS), con el propósito de incorporar el componente prebiótico que module la microbiota del lactante (Han et al., 2012). Con el avance de la tecnología alimentaria, se han venido desarrollando diferentes métodos biotecnológicos de síntesis de HMO.

3.1.1. Fábricas microbianas celulares

La producción de HMO por la industria, se inicia en la primera década del XXI, inicialmente pequeña y que no permitía su uso rutinario en fórmulas infantiles.

Así la empresa Glycom A/S produjo 2'-FL y LNnT en gran escala mediante síntesis química, a programas preclínicos y clínicos. Laboratorios como Abbott y Kyowa Hakko Kogyo Co., explotaron la capacidad biosintética de las células bacterianas, produciendo grandes cantidades de LNnT y oligosacáridos fucosilados (Bych et al., 2019). Tras años de investigación investigación los primeros HMO sintetizados a escala industrial, 2'-FL y LNnT, se realizó mediante ingeniería metabólica en *Escherichia coli*, ambos aprobados para uso humano tanto por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos FDA (del inglés *U.S. Food and Drug Administration*) y de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA (del inglés *European Food Safety Authority*) (Baumgärtner et al., 2015). Éstos demostraron ser seguros y bien tolerados, siendo utilizados actualmente en fórmulas infantiles en más de 30 países. La producción de HMO vía microbiana mostró ser una ruta potencialmente viable ya a fines de los 90s. Se utilizó *E. coli*, debido a su uso generalizado como herramienta de clonación e investigación, aparente idoneidad, seguridad, además de bajo nivel de lisis celular y baja formación de biomasa. Entre otras propiedades tiene bajos niveles de contaminantes tales como endotoxinas (LPS), proteína, ADN e impurezas de carbohidratos. Otros mecanismos han sido utilizados para la producción de HMO, tales *Corynebacterium glutamicum*, *Lactococcus lactis* y las especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo *Yarrowia lipolytica*. Actualmente la producción a gran escala de los HMO, se lleva a cabo en levaduras tal es el caso de 2'-FL, que al haber sido modificada facilita la absorción de la lactosa y la síntesis de GDP-fucosa, los dos precursores de 2'-FL, mediante la instalación de un transportador de lactosa y enzimas que convierten la GDP-manosa en GDP-fucosa. La producción de 2'-FL fue habilitada por la

expresión de α -1,2-fucosiltransferasas (Hollands et al., 2019). Todos estos organismos tienen el rótulo de seguridad GRAS (*generally regarded as safe*), para producir los HMO. En la Tabla 4, se detallan algunos HMO obtenidos por métodos biotecnológicos, según el huésped celular utilizado para la suplementación en fórmulas infantiles y productos para adultos.

Tabla 4. HMO obtenidos según el huésped utilizado

Elemento utilizado para biosíntesis	HMO obtenido
<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC9343	6'-SL
<i>Escherichia coli</i> K-12	2'-FL, DFL, LNT
<i>Escherichia coli</i> BL21	2'-FL
<i>Escherichia coli</i> NM522	3'-SL
<i>Escherichia coli</i> JM 107	3'-SL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2'-FL
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2'-FL
<i>Trypanozoma cruzi transialidasa</i>	3'-FL
Enzimas	3'-SL, 6'-SL

2'FL, 2'-fucosillactosa; 3'FL, 3'-Fucosillactosa; 3'-SL, 3'-Sialillactosa; 6'-SL, 6'-Sialillactosa; DFL, Difucosillactosa; LNT, Lacto-N-tetraosa

3.1.2. Síntesis química

La síntesis química de glucanos de cadena larga aún es un desafío para la industria farmacéutica y alimentaria. En fase sólida de la síntesis, los oligosacáridos obtenidos están unidos a un material insoluble (perlas o resinas), que permiten la separación rápida de productos de la reacción del exceso de reactivos solubles y de los solventes. En la actualidad se han acortado los tiempos de producción, utilizándose la síntesis de fase sólida automatizada (Han et al., 2012). De esta manera, más de 15 estructuras diferentes de HMO, incluyendo LNFP I, LNT y 2'-FL. Este proceso requiere el uso de reactivos tóxicos que además de encarecer el proceso de detoxificación de los mismos, no otorga seguridad para el empleo rutinario en fórmulas infantiles, estando restringido su uso como con fines analíticos, así como para generar conocimiento que nos permita el desarrollo de

métodos de síntesis químico-enzimática. Considerando el costo y beneficio a la fecha las fábricas microbianas celulares, pudiera ser una opción (Zeuner et al., 2019).

3.1.3. Síntesis enzimática *in vitro*

Las reacciones de glucosilación son desarrolladas por dos tipos de enzimas: glucosiltransferasas (GT) y glucósido hidrolasas (GH). Estas enzimas se clasifican de acuerdo a su secuencia en la Base de datos de Enzimas Activas para Carbohidratos CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes*). Mediante la metodología enzimática, se pueden producir los siguientes HMO:

a. Oligosacáridos neutrales no fucosilados

Se utilizan principalmente dos estrategias retrosintéticas para la estructura del núcleo tetrasacárido; el primero mimetiza la vía biosintética, la cual es la adición secuencial de la N-acetilglucosamina (GlcNAc) y posteriormente las unidades de galactosa (Gal) a lactosa y el segundo es el enfoque de síntesis convergente 2+2, donde los restos laminaribiosilo y lactosilo se condensan, imitando la vía biosintética. A través de este método se obtienen los siguientes HMO: Lacto-N-biosa (LNB), L-N-triosa II, 3'-galactosillactosa (3'-GalLac), Lacto-N-tetraosa (LNT), Lacto-N-neotetraosa (LNnT) y Lacto-N-neohexaosa (LNnH).

b. Oligosacáridos fucosilados

Para la síntesis de estos HMO, la fucosilación requiere de GDP-L-fucosa, como donante de sustrato y enzimas fucosiltransferasas con selectividades α 1,2, α 1,3 y α 1,4. De este modo, se han obtenido HMO fucosilados *in vitro*, utilizando α -fucosiltransferasas y α L-fucosidasas. Se han caracterizado diferentes α -fucosiltransferasas requeridas para la formación de enlaces

regioselectivos α 1,2, α 1,3 y α 1,4, pero sólo unas pocas exhiben actividad suficiente para aplicaciones sintéticas. Los HMO fucosilados obtenidos por este método son: 2'-fucosillactosa (2'-FL), 2',3-Difucosillactosa (DFL), Lacto-N-fucopentaosa I (LNFP I), Lacto-N-fucopentaosa II (LNFP II), Lacto-N-fucopentaosa III (LNFP III), Lacto-N-difucohexaosa I (LNDFH I), F-p-Lacto-N-neohexaosa (IFLNH III), F-Lacto-N-neohexaosa I (F-LNnH I), F-Lacto-N-neohexaosa II (F-LNnH II), DF-lacto-N-neohexaosa (DF-LNnH) y otros (1,2F-LNnH I, 1,2DF-LNnH, 1,2-1,3DF-LNnH I, 1,2-1,3DF-LNnH II, 1,2-1,3-TriF-LNnH I, 1,2-1,3-Tri-LNnH I, 1,2-1,3TriF-LNnH II y 1,2-1,3TF-LNnH).

c. Oligosacáridos sialilados

Utilizando sialiltransferasas se han obtenido HMOs sialilados- La mayoría de las reacciones de sialilación son desarrolladas entre el donante de ácido N-acetilneuramínico y aceptores con estructura lineal, algunas enzimas han sido diseñadas para sialilar oligosacáridos fucosilados ramificados. Se han utilizado α 2,6-sialidasas obtenidas de *Trypanosoma cruzi* y de *Arthrobacter ureafaciens* o *Bifidobacterium infantis*, además de α 2,6-sialiltransferasa proveniente de *Photobacterium leiognathi*. Los HMO sialilados obtenidos son: α 2,3-Sialillacto-N-biosa (3'SLNB), α 2,3-Sialillactosa (3'SL), α 2,6-Sialillactosa (6'SL), α 2,6-Sialillacto-N-tetraosa (LST a), α 2,6-Sialillactosa-N-neotetraosa (LST c) y α 2,6-Sialillacto-N-neohexaosa (S-LNnH II) (Fajjes et al., 2019).

d. Oligosacáridos sialilados y fucosilados

En la leche humana existen HMOs fucosilados y sialilados (mixtos), y hasta donde se sabe, resultan de la síntesis de la versión conjugada con enlazador,

en una micromatriz del glucano de 3'-SL3FL y FS-LNnH. Este 3'S3FL, fue obtenido de la lactosa, después de la sialilación y posterior fucosilación con enzimas glucosiltransferasas (ST3GAL4 y FUT3 respectivamente), obteniendo S-LNnH II.

4. Uso de HMO obtenidos de forma biotecnológica

Debido a sus características nutricionales y componentes bioactivos, la leche humana, sigue siendo el estándar de oro de la alimentación del recién nacido y lactante. Es considerada como el “simbiótico ideal” y cuyos componentes como los oligosacáridos (prebióticos), junto a la microbiota propia, conforman esa definición.

Desde que se conoce, que los HMO tienen efectos clínicos beneficiosos, como los ya mencionados con anterioridad, los fabricantes de fórmulas se han enfocado en desarrollar productos innovadores que sean lo más próximos a la composición de la leche humana y cumplan con sus propiedades funcionales.

5. Fórmulas lácteas infantiles suplementadas con HMO

La concentración de oligosacáridos de la leche humana (5-8%), es superior a la que presenta la leche de vaca (1%) y los presentes en fórmulas infantiles suplementadas (<4%). Las fórmulas infantiles fueron inicialmente suplementadas con diferentes tipos de oligosacáridos no humanos, que incluyeron a los galacto-oligosacáridos (GOS), los fructo-oligosacáridos (FOS) o mezclas de estos. Se demostró que la suplementación (con FOS e inulina) de fórmulas infantiles favorece el desarrollo de bifidobacterias, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Lugonja et al., 2010). Otros estudios, demostraron, que la suplementación de fórmulas con FOS y GOS tienen un efecto bifidogénico, si bien no favorecieron el crecimiento de lactobacilos, en comparación al grupo placebo (Moro et al., 2002) (Vandenplas et al., 2015).

La reciente disponibilidad de 2'-FL sintetizada con estructura idéntica a la 2'-FL de la leche humana, permite la disponibilidad de los HMO en algunas fórmulas comerciales para lactantes. En la actualidad se utilizan dos tipos de HMO, uno fucosilado como la 2'-Fucosillactosa (2'-FL) y otro neutro no fucosilado, como es la Lacto-N-neotetraosa (LNnT) y según la opinión de expertos, las fórmulas infantiles en general se consideran seguras y beneficiosas para los lactantes humanos (Sekerel et al., 2021).

5.1. Beneficios de las fórmulas infantiles suplementadas con HMO

Los resultados de estudios preclínicos realizados, indican que 2'-FL, ejerce múltiples funciones como prebiótico, antiinfeccioso, antiinflamatorio e inmunomodulador. Como se sabe la pequeña porción absorbida de manera intacta hacia el sistema circulatorio y excretada por la orina, explica los beneficios sistémicos de los HMO (Reverri et al., 2018).

5.1.1. Efectos sistémicos

5.1.1.1. Crecimiento y tolerancia a las fórmulas infantiles suplementadas con 2'-FL

El primer estudio publicado sobre fórmulas infantiles suplementadas con 2'-FL con una densidad calórica similar a la leche humana (64,3 Cal/dL), consistió en la administración desde el nacimiento hasta los 4 meses y se observó que en los lactantes que recibieron ésta, no hubo diferencias en el peso, la talla y la circunferencia craneal, en comparación a los alimentados con leche humana. Las fórmulas suplementadas con este HMO, fueron bien toleradas y su absorción fue similar a los amamantados con LH (Marriage et al., 2015).

La tolerancia a las fórmulas suplementadas con 2'-FL es adecuada, como se encontró en un estudio clínico aleatorizado a doble ciego en

lactantes, que recibieron éstas, desde su nacimiento hasta los 35 días de seguimiento. Se evaluó, volumen ingerido, presencia de vómitos, estándares antropométricos y consistencia de las heces, no encontrándose diferencias con los alimentados con LH (Kajzer et al., 2016).

En otro estudio clínico multicéntrico, llevado a cabo, en tres países europeos, entre 2018 a 2020, se evaluó la tolerancia y crecimiento (peso/talla), tras la administración de una fórmula suplementada con una mezcla de 5 HMO (2.99 g/L 2'-FL, 0.75 g/L 3'-FL, 1.5 g/L LNT, 0.23 g/L 3'-SL y 0.28 g/L 6'-SL), en 113 lactantes de ambos sexos, en el periodo de 14 días hasta los 112 días. En éstos se realizaron 6 controles en los que se compararon los mismos parámetros, con 2 grupos control, uno de 112 lactantes que recibió fórmula sin HMO, y otro de referencia (116 lactantes) que recibió lactancia materna exclusiva. El grupo de estudio, que recibió la mezcla de HMO, toleró muy bien la fórmula, produciendo heces blandas y crecimiento adecuado, concluyendo que la mezcla de cinco HMO es segura y bien tolerada por lactantes saludables a término durante los primeros meses de vida (Parschat et al., 2021).

5.1.1.2. Antiinfeccioso

Los HMO, sintetizados por biotecnología que han demostrado tener actividad contra diversos patógenos bacterianos por interacción directa son: 2'-FL (producido por biofermentación) contra *Campylobacter jejuni*, que reduce la invasión de línea celular HEp-2 (*Human Epidermoid Cancer Cells*) y HT-29 (*Human colon adenocarcinoma*); LNT (producido por biofermentación) tiene efecto antibacteriano y anti

formación de biopelículas para *Streptococcus* del Grupo B; fórmulas suplementadas con 2'-FL y 3'-FL, inhiben la adherencia bacteriana contra *C. jejuni*, *EPEC*, *E. coli*, *S.fyris* y *Pseudomona aeruginosa* (Morrin et al., 2021).

En relación con la actividad antiviral de los HMO, se ha visto que en los lactantes que reciben LH, donde algunos HMO expresan glucanos que pueden unirse a la superficie de las lectinas en las células del huésped, previenen que las moléculas virales se unan e invadan a éstas. Debido a que los HMO actúan como receptores señuelo solubles, pueden prevenir este tipo de infección. En el caso de los lactantes que toman fórmulas suplementadas con 2'-FL (1g/L) y LNnT (0,5 g/L), aún no está claro si la adaptación a la fórmula infantil suplementada con oligosacáridos simples modelados, tengan este beneficio (Wedekind & Shenker, 2021). Curiosamente la transmisión materno – infantil de VIH, ha disminuido en la actualidad hasta menos de 0,5%, en niños amamantados con LH exclusiva y madres con tratamiento antirretroviral, si bien con el uso de fórmulas estándar, aumenta hasta valores de 6 - 10%.

5.1.1.3. Inmunomodulador

La función inmunomoduladora de los HMO, es una de las más importantes, porque afecta de manera directa a las células del epitelio intestinal y modula la expresión génica, dando lugar a cambios en los glucanos de la superficie celular y de otras células de respuesta. Los HMO, modulan la producción de citoquinas linfocitarias y potencialmente llevan al balance de la respuesta de los linfocitos colaboradores T1 (Th1) sobre los Th2. Los efectos sobre los

biomarcadores en lactantes que recibieron fórmulas suplementadas con 2'-FL y GOS, presentaron concentraciones de citoquinas inflamatorias plasmáticas y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) más bajas (29% a 83%), que los lactantes alimentados con fórmula control (suplementada sólo con GOS). No hubo diferencias entre el grupo de estudio y los lactantes que recibieron LH. Estos hallazgos muestran que la suplementación de la fórmula infantil con 2'-FL, respalda aspectos del desarrollo inmunológico y regulación, similares a los efectos de la leche humana (Vandenplas et al., 2018).

En relación a la alergia alimentaria, uno de los últimos avances en el desarrollo de fórmulas hipoalérgicas o extensamente hidrolizadas es la suplementación con HMO (2'-FL y LNnT). Recientemente ha sido publicado un estudio doble ciego, que apoya esta suplementación donde se incluyeron a 64 niños de 2 a 4 años, con diagnóstico de alergia a la proteína de la leche de vaca. El grupo experimental, recibió una fórmula extensamente hidrolizada de proteína del suero con HMOs y el grupo control, un hidrolizado sin éstos. Los resultados mostraron que la fórmula extensamente hidrolizada, que contenía 2'-FL y LNnT, cumple con criterios de hipoalérgenicidad y puede ser recomendada para el tratamiento de alergia a la proteína de la leche de vaca (Nowak-Wegrzyn et al., 2019).

5.1.1.4. Desarrollo cerebral

Las células nerviosas de los mamíferos en comparación a otras células corporales, tienen un alto contenido de ácido siálico, el componente clave de los gangliósidos y moléculas de adhesión celular, que son muy

importantes durante el neurodesarrollo (desarrollo cerebral y cognitivo). La mayor parte del ácido siálico presente en el cerebro está asociada con los gangliósidos (65%) y glucoproteínas (32%), mientras que el ácido siálico libre, constituye menos del 3%. (Lis-Kuberka & Orczyk-Pawłowicz, 2019). Existen algunos estudios en animales sobre el impacto de uso de 2 HMO sialilados: 3'-sialillactosa (3'-SL) y 6'-sialillactosa (6'-SL). La concentración de éstos varía en la leche humana madura (0,17 a 0,50 g/L y 0,17 a 0,50 g/L, respectivamente) y la leche de vaca, 0,04 a 0,12 g/L en el caso de 3'-SL y 0,01 a 0,09 g/L en 6'-SL. Considerando que las fórmulas infantiles son producidas en base a leche de vaca, las concentraciones de estos oligosacáridos sialilados, son muy bajas. Existen algunos estudios en modelos animales (cerdos y ratones) a los cuales se les administraron 3'-SL y 6'-SL con buena tolerancia y discreto efecto sobre el comportamiento cognitivo comparado con los que recibieron fórmula estándar. Es necesario llevar a cabo ensayos clínicos aleatorizados y doble ciego en humanos (Hobbs et al., 2021).

5.1.2. Efecto prebiótico

Los HMO de la leche humana, que en su mayor proporción no son absorbidos y llegan intactos al intestino grueso, tras haber vencido la digestión gástrica y del intestino delgado, tienen efecto prebiótico en este segmento anatómico, con su característica bifidogénica. Las fórmulas infantiles suplementadas deberían tener el mismo efecto. En un ensayo clínico aleatorizado, que incluyó a 44 lactantes masculinos a quienes se les administró 2'-FL (1,0 a 1,2 g/L) y LNnT (0,5 a 0,6 g/L) en una fórmula reconstituida suplementada, *versus* dos grupos

control, uno recibió fórmula estándar y el otro, recibió leche humana, todos durante el lapso de 6 meses. Se realizaron estudios metataxonómicos, secuenciación del gen 16S ARNr de muestras fecales tomadas al nacimiento, a los 3 meses y 12 meses. A los 3 meses se observó que la conformación de la microbiota de aquellos que nacieron por cesárea (en teoría con disbiosis), había cambiado encontrando diferentes especies y subespecies de *Bifidobacterium*, considerado como punto positivo. También encontraron disminución de *E. coli* y Peptostreptococcaceae, familia a la cual pertenece *Clostridioides difficile*, cuya abundancia no fue muy diferente entre grupos. En las muestras del mes 12, no se encontraron cambios en la taxa todos los grupos. Si bien este estudio tiene muchas deficiencias, ofrece datos promisorios para el uso de HMO en fórmulas con efecto bifidogénico (B. Berger et al., 2020).

Los estudios *in vitro* han demostrado que los HMO son el prebiótico de preferencia para *Bifidobacterium infantis*, pero aún faltan más estudios realizados con fórmulas suplementadas (Vandenplas et al., 2018).

5.2. Uso de HMO en formulaciones para adultos

Los lactantes han sido los más favorecidos por la industria al contar con varias opciones de fórmulas suplementadas con HMO, en diferentes presentaciones desde fórmulas convencionales de inicio, seguimiento, hasta hidrolizados e incluso fórmulas con aminoácidos libres. En el caso de productos destinados a adultos, existen pocos productos comercializados, los componentes bioactivos de la leche humana pueden ser utilizados en otros productos alimentarios, suplementos nutricionales, nutracéuticos o inclusive pueden llevar oportunidades para la medicina traslacional (Sánchez et al., 2021).

5.2.1. Modulación de la microbiota y barrera intestinal

La microbiota intestinal, es un actor importante que influye en muchos aspectos de la fisiología humana en todo el ciclo de la vida. En lactantes, los HMO, modelan la microbiota, al estimular selectivamente el crecimiento de bacterias beneficiosas como las bifidobacterias, además tienen la capacidad de modular la función inmunológica y de barrera intestinal. Estas características los convierte en candidatos para restaurar una microbiota beneficiosa en adultos con disbiosis, y proporcionar beneficios para su salud. En un estudio clínico aleatorizado doble ciego formado por 10 grupos de adultos sanos, cada uno de ellos conformado por 10 voluntarios, se administró 2'-FL, LNnT o 2'-FL + LNnT (en cada grupo recibieron 5, 10 y 20 g/día) y placebo (2g de glucosa). Se tomaron muestras fecales para estudios de secuenciación y biomarcadores de inflamación intestinal (medidas de calprotectina fecal), además de muestras sanguíneas para estudios bioquímicos de rutina. En todos los grupos hubo buena tolerancia, sin manifestar cambios en su hábito intestinal. Los estudios de secuenciación del gen 16S ARNr, mostraron que los que recibieron HMO, presentaron abundancia de Actinobacterias (bifidobacterias), en relación al grupo que recibió placebo. También en los grupos suplementados con HMO, se observó una disminución de la abundancia de Firmicutes y Proteobacterias, observándose una disminución de patobiontes como Enterobacteriaceae. Este estudio confirmó el poder bifidogénico, seguridad y buena tolerancia de la suplementación de dos HMO, 2'-FL y LNnT, en adultos (Elison et al., 2016).

En otro estudio *in vitro*, utilizando un simulador de ecosistema microbiano intestinal humano (SHIME®), se observó que al administrar 2'-FL y LNnT, se obtiene efecto bifidogénico, aumento en la producción de butiratos, modulación

de la capacidad inmune y la mejora de la función de barrera. Estos estudios apoyan el uso potencial de estos HMO en adultos (Šuligoj et al., 2020).

5.2.2. Enfermedades crónicas gastrointestinales

En los adultos se ha descrito la presencia de disbiosis en ciertas enfermedades de origen gastrointestinal como el síndrome de intestino irritable, enfermedad celiaca y la enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y Crohn).

Debido a que existe poca información de la función bifidogénica de los HMO suplementados en fórmulas para adultos, se realizaron estudios *in vitro*, utilizando combinaciones potenciales simbióticas: 2'-FL + *Lactobacillus acidophilus* NCFM (ATCC 5221 + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07 (ATCC 5220); 2'-FL + *Lactobacillus rhamnosus* GG; 2'-FL + *Lactobacillus salivarius* UCC118 y otros, con el propósito de determinar diferencias significativas en la fermentación, con la línea de base utilizando el mismo sustrato. La segunda parte del estudio fue de intervención clínica, en la que se reclutaron a 20 pacientes, con edad promedio de 31 años, con diagnóstico de síndrome de intestino irritable, enfermedad celiaca y enfermedad inflamatoria intestinal, a quienes se les administró de manera aleatoria una fórmula nutricional compuesta de 2'-FL más micronutrientes (vitaminas A, B₆, B₁₂, C, D₃, E, biotina, calcio, cromo, cobre, folatos, yodo, hierro, magnesio, ácido pantoténico, fósforo, riboflavina, selenio, tiamina y zinc), macronutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas y fibra), aminoácidos e ismalto-oligosacáridos. Un grupo de pacientes recibió una fórmula similar, pero sin HMO. Esta mezcla se administró en zumos, 2 veces al día sumando un total de 4 gramos de 2'-FL por día. Los resultados mostraron en la primera fase del modelo fermentativo *in vitro*, un incremento de *Bifidobacterium* y producción de ácidos grasos de cadena corta, en especial de ácido butírico. En los pacientes con

diagnóstico de síndrome de intestino irritable y enfermedad inflamatoria intestinal que recibieron la fórmula con 2'-FL, se observó una importante mejoría de los síntomas intra y extraintestinales y mayor producción de ácido butírico. En el grupo de celíacos, no hubo referencia de cambios (Ryan et al., 2021). Debido al tamaño de muestra, no se puede inferir la relación directa con el compuesto probado, pero da expectativas positivas, para el uso de estos HMO en las enfermedades estudiadas, necesiándose más estudios.

6. Disponibilidad y regulación de productos disponibles con HMO

A medida que la tecnología mejora la producción de estructuras idénticas a los HMO, a través de diferentes técnicas biotecnológicas, ha aumentado la posibilidad de suplementar alimentos comunes como las fórmulas lácteas infantiles o bebidas lácteas o formulaciones (polvo o cápsulas) para uso en adultos. Empresas grandes como Nestlé, Danone, Abbott entre otras tienen en el mercado estos productos suplementados no solamente con HMO, sino también con otros compuestos bioactivos presentes en la leche humana. El propósito además de nutrir es conferir a estos productos el efecto funcional que se ha comprobado en la LH. En la Tabla 5, se presentan algunos ejemplos de los productos para niños, comercializados en diferentes continentes. Se debe aclarar que no existe uniformidad de presentación a nivel mundial, observándose que en algunos casos con el mismo nombre pueden estar o no suplementados con HMO.

Para la comercialización de los productos, tanto la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, deben dar el aval para su comercialización y uso, considerando la característica de seguridad.

Tabla 5. Fórmulas lácteas infantiles disponibles en el mercado

Formularia comercial	Tipo de fórmula	HMOs y concentración g/L (fórmula reconstituida)	Efectos en la salud y usos	Referencia
Similac® Pro advanced (Abbott)	Fórmula de inicio (0 a 6 meses)	2'-FL 1,0 g	Crecimiento ponderal, lineal y perímetro craneano apropiados (similar a los niños que tomaron LH)	(Marriage et al., 2015)
NAN optipro 1® (Nestlé)	Fórmula de inicio (0 a 6 meses)	2'-FL 1,0 g	Crecimiento lineal apropiado (similar a los niños que tomaron LH) Menor morbilidad (bronquitis)	(Puccio et al., 2017)
NAN optipro 2® (Nestlé)	Fórmula de continuación (6 a 12 meses)	2'-FL 0,2 g	Buena tolerancia, heces blandas	(Puccio et al., 2017)
Althéra® HMO(Nestlé)	Hidrolizado extenso	2'-FL 1,0 g LNnT 0,5 g	Hipoalergénica en casos de alergia a la proteína de la leche de vaca	(Nowak-Wegrzyn et al., 2019)
Aptamil Profutura Duoadvance 1® (Danone)	Fórmula de inicio (0 a 6 meses)	2'-FL 0,10 g	Crecimiento ponderal y bien tolerada	(Salminen et al., 2020)
Aptamil Profutura Duoadvance 2® (Danone)	Fórmula de continuación (6 a 12 meses)	2'-FL 0,05 g 3'-GL 0,015 g	Crecimiento ponderal y bien tolerada	(Salminen et al., 2020)

2'-Fucosillactosa 2'-FL; Lacto-N-neotetraosa LNnT; 3'-Galactosillactosa 3'-GL

En el caso de la EFSA y FDA (notificación GRAS) “Generalmente reconocido como seguro”, se tienen aprobados:

- EFSA: 2'-Fucosillactosa (2'-FL), en niños y adultos para uso en varios niveles en una amplia selección de alimentos y bebidas; de acuerdo con la necesidad de alimentos en condiciones especiales para propósitos médicos; 1,2 a 3,0 g/día en alimentos suplementados para niños pequeños y población en general. FDA: GRAS 650.
- EFSA: Lacto-N-neotetraosa (LNnT), en niños y adultos para uso en varios niveles en una amplia selección de alimentos y bebidas; de acuerdo con la necesidad de alimentos en condiciones especiales para propósitos médicos; 0,6 a 1,5 g/día en alimentos suplementados para niños pequeños y población en general. FDA: GRAS 659.

- EFSA: Lacto-N-tetraosa (LNT), en niños y adultos para uso en varios niveles en una amplia selección de alimentos y bebidas; de acuerdo con la necesidad de alimentos en condiciones especiales para propósitos médicos; 2,0 g/día en suplementos alimentarios. FDA: GRAS 833.
- EFSA: 3'-Sialilactosa (3'-SL), en niños y adultos para uso en varios niveles en una amplia selección de alimentos y bebidas; de acuerdo con la necesidad de alimentos en condiciones especiales para propósitos médicos; 0,5 g/día en suplementos alimentarios (excepto en niños pequeños). FDA: GRAS 880.
- EFSA: 6'-Sialilactosa (6'-SL), en niños y adultos para uso en varios niveles en una amplia selección de alimentos y bebidas; de acuerdo con la necesidad de alimentos en condiciones especiales para propósitos médicos; hasta 1,0 g/día en bebidas, hasta 10g/kg en alimentos y 1 g/día en suplementos alimentarios (excepto en niños pequeños). FDA: GRAS 881.
- 2'-Fucosilactosa/Difucosilactosa (2'-FL/DFL), en niños y adultos para uso en varios niveles en una amplia selección de alimentos y bebidas; de acuerdo con la necesidad de alimentos en condiciones especiales para propósitos médicos; 4,0 g/día en suplementos alimentarios. FDA: GRAS 815. (Salminen, 2017), (Walsh et al., 2020).

7. Conclusiones

La leche humana es el estándar de oro de alimento que proporciona macro y micronutrientes, pero además cuenta con elementos bioactivos que proporcionan diferentes propiedades, tanto en la esfera inmunológica, respuesta a infecciones, antiinflamatoria, protección de barrera intestinal, modulación de la microbiota, desarrollo neuro-comportamental e intelecto y además efectos potenciales anticancerígenos. De todos estos componentes, los oligosacáridos de la leche humana (HMO), prácticamente cumple todas

estas funciones. En casos que el recién nacido o el lactante no pueda beneficiarse de la leche humana, la alternativa es nutrirlo con fórmula láctea idealmente suplementada con factores bioactivos, probióticos y como en el caso de esta revisión con HMO obtenidos a través de síntesis biotecnológica. En adultos además de los efectos beneficiosos observados en lactantes, en casos de enfermedades digestivas crónicas como el síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer y otras entidades se pueden beneficiar al modular la microbiota, considerando que éstas cursan con disbiosis. Dado que su suplementación es segura a dosis aprobadas por EFSA y FDA, permite continuar con estudios clínicos, aprovechando el avance de la tecnología. En la actualidad se están estudiando nuevos campos de uso de los HMO relacionados con la microbiota como el caso de potenciar el crecimiento de otras bacterias además de bifidobacterias como es el caso de *Akkermansia muciniphila*, que tiene muchas propiedades beneficiosas para la salud del ser humano (Luna et al., 2021).

Un factor negativo hasta el momento es la disponibilidad en todos los países, costo y como consecuencia a este último punto el apego al uso terapéutico o preventivo de los HMO. Hasta la fecha, los HMO más estudiados y utilizados en productos comerciales tanto en fórmulas infantiles como productos para adultos son 2'-Fucosillactosa, L-N-neotetraosa, que han demostrado seguridad y resultados beneficiosos para el ser humano.

En relación a las perspectivas futuras, el desarrollo de técnicas metabolómicas, nos permitirá determinar de manera más prolija la concentración de HMO en la leche humana, de manera rutinaria y así suplementar (inclusive a los lactantes que reciben leche humana) los oligosacáridos faltantes o deficientes (Corona et al., 2021). También es importante pensar que para el futuro se podrá utilizar la dosificación del contenido de disialillacto-N-tetraose (DSLNT) en la leche materna como un marcador potencial no invasivo para

identificar a los recién nacidos en riesgo de desarrollar enterocolitis necrosante (ECN) y evaluar la leche de donantes de alto riesgo.

Referencias

- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric clinics of North America*, *60*(1), 49-74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Baumgärtner, F., Sprenger, G. A., & Albermann, C. (2015). Galactose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* for the production of lacto-N-tetraose. *Enzyme and Microbial Technology*, *75-76*, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.04.009>
- Berger, B., Porta, N., Foata, F., Grathwohl, D., Delley, M., Moine, D., Charpagne, A., Siegwald, L., Descombes, P., Alliet, P., Puccio, G., Steenhout, P., Mercenier, A., & Sprenger, N. (2020). Linking Human Milk Oligosaccharides, Infant Fecal Community Types, and Later Risk To Require Antibiotics. *mBio*, *11*(2), e03196-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03196-19>
- Berger, P. K., Plows, J. F., Demerath, E. W., & Fields, D. A. (2020). Carbohydrate composition in breast milk and its effect on infant health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *23*(4), 277-281. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000658>
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, *22*(9), 1147-1162. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>
- Bych, K., Mikš, M. H., Johanson, T., Hederos, M. J., Vignsnaes, L. K., & Becker, P. (2019). Production of HMOs using microbial hosts—From cell engineering to large scale production. *Current Opinion in Biotechnology*, *56*, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.003>
- Carr, L. E., Virmani, M. D., Rosa, F., Munblit, D., Matazel, K. S., Elolimy, A. A., & Yeruva, L. (2021). Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Frontiers in Immunology*, *12*, 604080. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.604080>
- Chen, X. (2015). Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *72*, 113-190. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2015.08.002>
- Chichlowski, M., Shah, N., Wampler, J. L., Wu, S. S., & Vanderhoof, J. A. (2020). *Bifidobacterium longum* Subspecies *infantis* (*B. infantis*) in Pediatric Nutrition: Current State of Knowledge. *Nutrients*, *12*(6), 1581. <https://doi.org/10.3390/nu12061581>

- Corona, L., Lussu, A., Bosco, A., Pintus, R., Cesare Marincola, F., Fanos, V., & Dessì, A. (2021). Human Milk Oligosaccharides: A Comprehensive Review towards Metabolomics. *Children*, 8(9), 804. <https://doi.org/10.3390/children8090804>
- Demmelair, H., & Koletzko, B. (2018). Lipids in human milk. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(1), 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.11.002>
- Docq, S., Spoelder, M., Wang, W., & Homberg, J. R. (2020). The Protective and Long-Lasting Effects of Human Milk Oligosaccharides on Cognition in Mammals. *Nutrients*, 12(11), 3572. <https://doi.org/10.3390/nu12113572>
- Donovan, S. M., & Comstock, S. S. (2016). Human Milk Oligosaccharides Influence Neonatal Mucosal and Systemic Immunity. *Annals of nutrition & metabolism*, 69(Suppl 2), 42-51. <https://doi.org/10.1159/000452818>
- El-Hawiet, A., Kitova, E. N., & Klassen, J. S. (2015). Recognition of human milk oligosaccharides by bacterial exotoxins. *Glycobiology*, 25(8), 845-854. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv025>
- Elison, E., Vigsnaes, L. K., Krogsgaard, L. R., Rasmussen, J., Sørensen, N., McConnell, B., Hennet, T., Sommer, M. O. A., & Bytzer, P. (2016). Oral supplementation of healthy adults with 2'-O-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose is well tolerated and shifts the intestinal microbiota. *British Journal of Nutrition*, 116(8), 1356-1368. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003354>
- Eriksen, K. G., Christensen, S. H., Lind, M. V., & Michaelsen, K. F. (2018). Human milk composition and infant growth. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 21(3), 200-206. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000466>
- Faijes, M., Castejón-Vilatersana, M., Val-Cid, C., & Planas, A. (2019). Enzymatic and cell factory approaches to the production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 37(5), 667-697. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.014>
- Fischer Fumeaux, C. J., Garcia-Rodenas, C. L., De Castro, C. A., Courtet-Compondu, M.-C., Thakkar, S. K., Beauport, L., Tolsa, J.-F., & Affolter, M. (2019). Longitudinal Analysis of Macronutrient Composition in Preterm and Term Human Milk: A Prospective Cohort Study. *Nutrients*, 11(7), 1525. <https://doi.org/10.3390/nu11071525>

- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*(8), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gila-Diaz, A., Arribas, S. M., Algara, A., Martín-Cabrejas, M. A., López de Pablo, Á. L., Sáenz de Pipaón, M., & Ramiro-Cortijo, D. (2019). A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk A Focus on Prematurity. *Nutrients*, *11*(6), 1307. <https://doi.org/10.3390/nu11061307>
- Goehring, K. C., Kennedy, A. D., Prieto, P. A., & Buck, R. H. (2014). Direct Evidence for the Presence of Human Milk Oligosaccharides in the Circulation of Breastfed Infants. *PLoS ONE*, *9*(7), e101692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101692>
- Han, N. S., Kim, T.-J., Park, Y.-C., Kim, J., & Seo, J.-H. (2012). Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, *30*(6), 1268-1278. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.003>
- Hobbs, M., Jahan, M., Ghorashi, S. A., & Wang, B. (2021). Current Perspective of Sialylated Milk Oligosaccharides in Mammalian Milk: Implications for Brain and Gut Health of Newborns. *Foods*, *10*(2), 473. <https://doi.org/10.3390/foods10020473>
- Hollands, K., Baron, C. M., Gibson, K. J., Kelly, K. J., Krasley, E. A., Laffend, L. A., Lauchli, R. M., Maggio-Hall, L. A., Nelson, M. J., Prasad, J. C., Ren, Y., Rice, B. A., Rice, G. H., & Rothman, S. C. (2019). Engineering two species of yeast as cell factories for 2'-fucosyllactose. *Metabolic Engineering*, *52*, 232-242. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.005>
- Jantscher-Krenn, E., Aigner, J., Reiter, B., Köfeler, H., Csapo, B., Desoye, G., Bode, L., & van Poppel, M. N. M. (2019). Evidence of human milk oligosaccharides in maternal circulation already during pregnancy: A pilot study. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *316*(3), E347-E357. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00320.2018>

- Jantscher-Krenn, E., Marx, C., & Bode, L. (2013). Human milk oligosaccharides are differentially metabolised in neonatal rats. *British Journal of Nutrition*, *110*(4), 640-650.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512005727>
- Kajzer, J., Oliver, J., & Marriage, B. (2016). Gastrointestinal Tolerance of Formula Supplemented with Oligosaccharides. *The FASEB Journal*, *30*(S1), 671.4-671.4.
https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.671.4
- Kunz, C. (2012). Historical Aspects of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition*, *3*(3), 430S-439S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001776>
- Kunz, C., & Rudloff, S. (2017). Compositional Analysis and Metabolism of Human Milk Oligosaccharides in Infants. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, *88*, 137-147.
<https://doi.org/10.1159/000455398>
- Lis-Kuberka, J., & Orczyk-Pawilowicz, M. (2019). Sialylated Oligosaccharides and Glycoconjugates of Human Milk. The Impact on Infant and Newborn Protection, Development and Well-Being. *Nutrients*, *11*(2), 306. <https://doi.org/10.3390/nu11020306>
- Lodge, C. J., Lowe, A. J., Milanzi, E., Bowatte, G., Abramson, M. J., Tsimiklis, H., Axelrad, C., Robertson, B., Darling, A. E., Svanes, C., Wjst, M., Dharmage, S. C., & Bode, L. (2021). Human milk oligosaccharide profiles and allergic disease up to 18 years. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *147*(3), 1041-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.06.027>
- Lugonja, N. M., Martinov, O. B., Rasovic, M. R., Spasic, S. D., Gojgic, G. Dj., & Vrvic, M. M. (2010). A Comparative Investigation of an in vitro and Clinical Test of the Bifidogenic Effect of an Infant Formula. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *47*(3), 208-216.
<https://doi.org/10.3164/jcbtn.10-54>
- Luna, E., Parkar, S. G., Kirmiz, N., Hartel, S., Hearn, E., Hossine, M., Kurdian, A., Mendoza, C., Orr, K., Padilla, L., Ramirez, K., Salcedo, P., Serrano, E., Choudhury, B., Paulchakrabarti, M., Parker, C. T., Huynh, S., Cooper, K., & Flores, G. E. (2021). Utilization efficiency of human milk oligosaccharides by human-associated *Akkermansia* is strain-dependent. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM0148721. <https://doi.org/10.1128/AEM.01487-21>

- Marriage, B. J., Buck, R. H., Goehring, K. C., Oliver, J. S., & Williams, J. A. (2015). Infants Fed a Lower Calorie Formula With 2'FL Show Growth and 2'FL Uptake Like Breast-Fed Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *61*(6), 649-658.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000889>
- Mazzocchi, A., Gianni, M. L., Morniroli, D., Leone, L., Roggero, P., Agostoni, C., De Cosmi, V., & Mosca, F. (2019). Hormones in Breast Milk and Effect on Infants' Growth: A Systematic Review. *Nutrients*, *11*(8), 1845. <https://doi.org/10.3390/nu11081845>
- Moro, G., Minoli, I., Mosca, M., Fanaro, S., Jelinek, J., Stahl, B., & Boehm, G. (2002). Dosage-Related Bifidogenic Effects of Galacto- and Fructooligosaccharides in Formula-Fed Term Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *34*(3), 291-295.
- Morrin, S. T., Buck, R. H., Farrow, M., & Hickey, R. M. (2021). Milk-derived anti-infectives and their potential to combat bacterial and viral infection. *Journal of Functional Foods*, *81*, 104442. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104442>
- Moubareck, C. A. (2021). Human Milk Microbiota and Oligosaccharides: A Glimpse into Benefits, Diversity, and Correlations. *Nutrients*, *13*(4), 1123. <https://doi.org/10.3390/nu13041123>
- Nowak-Wegrzyn, A., Czerkies, L., Reyes, K., Collins, B., & Heine, R. G. (2019). Confirmed Hypoallergenicity of a Novel Whey-Based Extensively Hydrolyzed Infant Formula Containing Two Human Milk Oligosaccharides. *Nutrients*, *11*(7), 1447.
<https://doi.org/10.3390/nu11071447>
- Parschat, K., Melsaether, C., Jäpelt, K. R., & Jennewein, S. (2021). Clinical Evaluation of 16-Week Supplementation with 5HMO-Mix in Healthy-Term Human Infants to Determine Tolerability, Safety, and Effect on Growth. *Nutrients*, *13*(8), 2871.
<https://doi.org/10.3390/nu13082871>
- Puccio, G., Alliet, P., Cajozzo, C., Janssens, E., Corsello, G., Sprenger, N., Wernimont, S., Egli, D., Gosoni, L., & Steenhout, P. (2017). Effects of Infant Formula With Human Milk Oligosaccharides on Growth and Morbidity: A Randomized Multicenter Trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *64*(4), 624-631.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001520>

- Ray, C., Kerketta, J. A., Rao, S., Patel, S., Dutt, S., Arora, K., Pournami, F., & Bhushan, P. (2019). Human Milk Oligosaccharides: The Journey Ahead. *International Journal of Pediatrics*, 2019, e2390240. <https://doi.org/10.1155/2019/2390240>
- Reverri, E. J., Devitt, A. A., Kajzer, J. A., Baggs, G. E., & Borschel, M. W. (2018). Review of the Clinical Experiences of Feeding Infants Formula Containing the Human Milk Oligosaccharide 2'-Fucosyllactose. *Nutrients*, 10(10), 1346. <https://doi.org/10.3390/nu10101346>
- Rudloff, S., & Kunz, C. (2012). Milk Oligosaccharides and Metabolism in Infants. *Advances in Nutrition*, 3(3), 398S-405S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001594>
- Ryan, J. J., Monteagudo-Mera, A., Contractor, N., & Gibson, G. R. (2021). Impact of 2'-Fucosyllactose on Gut Microbiota Composition in Adults with Chronic Gastrointestinal Conditions: Batch Culture Fermentation Model and Pilot Clinical Trial Findings. *Nutrients*, 13(3), 938. <https://doi.org/10.3390/nu13030938>
- Salminen, S. (2017). Regulatory Aspects of Human Milk Oligosaccharides. *Intestinal Microbiome: Functional Aspects in Health and Disease*, 88, 161-170. <https://doi.org/10.1159/000455400>
- Salminen, S., Stahl, B., Vinderola, G., & Szajewska, H. (2020). Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives. *Nutrients*, 12(7), 1952. <https://doi.org/10.3390/nu12071952>
- Samuel, T. M., Zhou, Q., Giuffrida, F., Munblit, D., Verhasselt, V., & Thakkar, S. K. (2020). Nutritional and Non-nutritional Composition of Human Milk Is Modulated by Maternal, Infant, and Methodological Factors. *Frontiers in Nutrition*, 7, 172. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.576133>
- Sánchez, C., Franco, L., Regal, P., Lamas, A., Cepeda, A., & Fente, C. (2021). Breast Milk: A Source of Functional Compounds with Potential Application in Nutrition and Therapy. *Nutrients*, 13(3), 1026. <https://doi.org/10.3390/nu13031026>
- Sekerel, B. E., Bingol, G., Cullu Cokugras, F., Cokugras, H., Kansu, A., Ozen, H., & Tamay, Z. (2021). An Expert Panel Statement on the Beneficial Effects of Human Milk Oligosaccharides (HMOs) in Early Life and Potential Utility of HMO-Supplemented Infant

- Formula in Cow's Milk Protein Allergy. *Journal of Asthma and Allergy*, *14*, 1147-1164.
<https://doi.org/10.2147/JAA.S323734>
- Soyyılmaz, B., Mikš, M. H., Röhrig, C. H., Matwiejuk, M., Meszaros-Matwiejuk, A., & Vignæs, L. K. (2021). The Mean of Milk: A Review of Human Milk Oligosaccharide Concentrations throughout Lactation. *Nutrients*, *13*(8), 2737. <https://doi.org/10.3390/nu13082737>
- Stahl, B., Thurl, S., Henker, J., Siegel, M., Finke, B., & Sawatzki, G. (2001). Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *501*, 299-306.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1371-1_37
- Šuligoj, T., Vignæs, L. K., den Abbeele, P. V., Apostolou, A., Karalis, K., Savva, G. M., McConnell, B., & Juge, N. (2020). Effects of Human Milk Oligosaccharides on the Adult Gut Microbiota and Barrier Function. *Nutrients*, *12*(9), 2808. <https://doi.org/10.3390/nu12092808>
- Triantis, V., Bode, L., & van Neerven, R. J. J. (2018). Immunological Effects of Human Milk Oligosaccharides. *Frontiers in Pediatrics*, *6*, 190. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00190>
- Underwood, M. A., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2015). Bifidobacterium longum subspecies infantis: Champion colonizer of the infant gut. *Pediatric research*, *77*(0), 229-235.
<https://doi.org/10.1038/pr.2014.156>
- Urashima, T., Hirabayashi, J., Sato, S., & Kobata, A. (2018). Human Milk Oligosaccharides as Essential Tools for Basic and Application Studies on Galectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, *30*(172), SE51-SE65. <https://doi.org/10.4052/tigg.1734.1SE>
- Vandenplas, Y., Berger, B., Carnielli, V. P., Ksiazek, J., Lagström, H., Sanchez Luna, M., Migacheva, N., Mosselmans, J.-M., Picaud, J.-C., Possner, M., Singhal, A., & Wabitsch, M. (2018). Human Milk Oligosaccharides: 2'-Fucosyllactose (2'-FL) and Lacto-N-Neotetraose (LNnT) in Infant Formula. *Nutrients*, *10*(9), 1161. <https://doi.org/10.3390/nu10091161>
- Vandenplas, Y., Zakharova, I., & Dmitrieva, Y. (2015). Oligosaccharides in infant formula: More evidence to validate the role of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, *113*(9), 1339-1344.
<https://doi.org/10.1017/S0007114515000823>

- Vazquez, E., Santos-Fandila, A., Buck, R., Rueda, R., & Ramirez, M. (2017). Major human milk oligosaccharides are absorbed into the systemic circulation after oral administration in rats. *British Journal of Nutrition*, *117*(2), 237-247. <https://doi.org/10.1017/S0007114516004554>
- Walsh, C., Lane, J. A., van Sinderen, D., & Hickey, R. M. (2020). From lab bench to formulated ingredient: Characterization, production, and commercialization of human milk oligosaccharides. *Journal of Functional Foods*, *72*, 104052. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104052>
- wbw-2020-joint-letter—Unicef-who.pdf*. (s. f.). Recuperado 13 de septiembre de 2021, de https://cdn.who.int/media/docs/default-source/breastfeeding/wbw-2020-joint-letter---unicef-who.pdf?sfvrsn=80789d42_2
- Wedekind, S. I. S., & Shenker, N. S. (2021). Antiviral Properties of Human Milk. *Microorganisms*, *9*(4), 715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040715>
- Zeuner, B., Teze, D., Muschiol, J., & Meyer, A. S. (2019). Synthesis of Human Milk Oligosaccharides: Protein Engineering Strategies for Improved Enzymatic Transglycosylation. *Molecules*, *24*(11), 2033. <https://doi.org/10.3390/molecules24112033>