

## ORIGINAL

# Ingrediente rico en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) como fuente de gangliósidos en preparados para lactantes

L. Claumarchirant<sup>1</sup>, L.M. Sánchez-Siles<sup>2</sup>, A. Alegría<sup>1</sup>, M.J. Lagarda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universitat de València. Burjassot (Valencia).

<sup>2</sup>Instituto de Nutrición Infantil Hero. Grupo Hero. Alcantarilla (Murcia)

## Resumen

**Introducción:** Los gangliósidos (GG) son compuestos bioactivos importantes para el lactante, con beneficios sobre el desarrollo neuronal, el sistema inmunitario... Están presentes en la leche humana (LH) y, en menor cantidad, también en los preparados para lactantes (PL). Con el objetivo de evaluar el resultado de añadir a los PL un ingrediente rico en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) y asemejar los contenidos de GG a la LH, se determina el contenido total de GG en diferentes PL comercializados en el mercado europeo. Además, se estima la ingesta de GG en los lactantes alimentados con estos PL.

**Material y métodos:** Se determina el contenido de GG en 13 PL comercializados en Europa mediante espectrofotometría, utilizando el reactivo colorimétrico resorcinol. Para las ingestas, se utilizan volúmenes medios de PL ingeridos por 1.113 lactantes, obtenidos de la bibliografía, correspondientes a los primeros 6 meses.

**Resultados y discusión:** El contenido de GG en los PL varía de 0,30 a 2,69 mg de ácido siálico unido a lípidos por litro (ASUL/L); los mayores contenidos de GG los proporcionan los PL que llevan adicionado en su formulación el ingrediente rico en MFGM (1,23-2,69 mg de ASUL/L). De los PL con MFGM, el que presenta contenidos significativamente mayores es el PL-6 ( $p < 0,05$ ). Con independencia del PL, la ingesta diaria de GG es mayor en los PL con MFGM, que se sitúa entre 0,58 y 0,94 mg de ASUL/día.

**Conclusiones:** La adición de MFGM a los PL es una buena estrategia para mejorar los contenidos e ingestas de GG en PL.

©2017 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

## Palabras clave

Gangliósidos, preparados para lactantes, membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM), ingestas

## Abstract

**Title:** Ingredient rich in milk fat globule membrane (MFGM) as a source of gangliosides in infant formula

**Introduction:** Gangliosides (GG) are important bioactive compounds for the newborn (normal neuron development, immune system, etc.), present in human milk (HM) and in lesser amounts in infant formulas (IFs). With the aim of evaluating the influence of the addition of an ingredient rich in milk fat globule membrane (MFGM) and in order to obtain amounts of GG similar to those found in HM, the total GG content was determined in several IFs marketed in Europe. In addition, the GG intake by infants fed with these formulas was estimated.

**Material and methods:** Thirteen powdered cows' milk-based IFs marketed in Europe were analyzed by spectrophotometry, using the resorcinol method. To estimate GG intake, average IF volume of 1,113 newborn corresponding to the first 6 months of life, obtained from the literature, were used.

**Results and discussion:** The total content of GG of the 13 IFs ranges between 0.30 to 2.69 mg ASUL/L, presenting the highest contents of GG, the IFs enriched with MFGM (1.23-2.69 mg ASUL/L). Of the IFs enriched with MFGM, the higher statistically significant value ( $p < 0.05$ ) was found in IF-6. The dairy intake of GG was higher in IF enriched with MFGM and independently of IF ranges from 0.58 to 0.94 mg ASUL/day.

**Conclusions:** The addition of ingredients rich in MFGM in IFs improves the content and daily intake of GG.

©2017 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

## Keywords

Gangliosides, infant formulas, milk fat globule membrane (MFGM), intakes

## Introducción

La leche humana (LH) y los preparados para lactantes (PL) contienen gangliósidos (GG), que son compuestos bioactivos importantes para el desarrollo neuronal del lactante<sup>1</sup>. Además, los GG ayudan a regular el sistema inmunitario, contribuyen a la maduración intestinal<sup>2</sup>, tienen funciones protectoras contra patógenos entéricos<sup>2,3</sup> y estimulan la proliferación de bifidobacterias en el intestino de los lactantes<sup>2</sup>. Debido a todas estas funciones biológicas, ha despertado gran interés la determinación del contenido de GG en los PL, sustitutos de la LH cuando la lactancia materna no es posible.

Los GG son un grupo complejo de glicoesfingolípidos, constituidos por una ceramida (núcleo hidrofóbico) y una cadena oligosacárida hidrofílica que contiene al menos un resto de ácido siálico. La ceramida se compone principalmente de una base esfingoide unida mediante un enlace amida a un ácido graso con una longitud de cadena y saturación variable<sup>4</sup>.

Los GG pueden ser determinados indirectamente, mediante espectrofotometría de absorción molecular con reactivo resorcinol, y expresarse como ácido siálico unido a lípidos (ASUL)<sup>5</sup>, o directamente, por cromatografía líquida con espectrofotometría de masas, y expresarse como GG. Los predominantes en la LH son el disialogangliósido 3 (GD<sub>3</sub>) y el monosialogangliósido 3 (GM<sub>3</sub>). En la LH, el contenido y el perfil de GG cambian a lo largo de la lactancia: se pasa de 7 mg de ASUL/L en el calostro (70% de GD<sub>3</sub> y 9% de GM<sub>3</sub>) a 4 mg de ASUL/L en la LH madura (9% de GD<sub>3</sub> y 85% de GM<sub>3</sub>)<sup>6,7</sup>. Comparados con la LH, los PL proporcionan menores cantidades de GG y un perfil diferente: se sitúan en 0,4-6,2 mg de ASUL/L<sup>3,8-11</sup> y en 5-11,4 mg de GG/L<sup>12</sup> o 3,5-18,9 mg de GG/100 g<sup>13,14</sup>; el mayoritario es el GD<sub>3</sub> (82-65%), seguido por el GM<sub>3</sub> (0,3-11%).

En la formulación de los PL se intenta que su composición y su funcionalidad se parezcan lo más posible a las de la LH. En este sentido, existen ingredientes ricos en compuestos bioactivos que pueden ser añadidos a la formulación de PL, como grasa láctea, beta-suero, proteínas del suero desmineralizado o proteínas del suero concentradas<sup>8,13</sup>. Particularmente, el concentrado de proteínas séricas rico en membrana del glóbulo graso de la leche (*milk fat globule membrane* [MFGM]) es una buena fuente de GG<sup>11,13</sup>.

En los últimos años ha crecido el interés por la estructura y composición de los glóbulos grasos de la leche<sup>15</sup>, en parte debido a las actividades biológicas relacionadas con la MFGM. Los lípidos bioactivos de la MFGM están compuestos principalmente por fosfolípidos<sup>16</sup>, colesterol<sup>17</sup> y GG<sup>11</sup>. Algunos estudios recientes han descrito efectos beneficiosos sobre el desarrollo neuronal y de defensa contra las infecciones en lactantes<sup>18</sup>. En un ensayo clínico realizado en Suecia, en el grupo de niños alimentados con una fórmula enriquecida con MFGM se observó un desarrollo cognitivo similar al de los niños alimentados con LH<sup>19</sup>, así como una menor incidencia de otitis media que en el grupo control<sup>20</sup>. Aunque no se han llevado a cabo estudios clínicos con los componentes individuales de la MFGM, la suplementación de MFGM en los PL puede reducir las diferencias en el desarrollo cognitivo y las infecciones entre los lactantes amamantados y los alimentados con PL<sup>18</sup>.

En este estudio se determina el contenido total de GG en diferentes PL, con y sin adición de MFGM, comercializados en el mercado europeo. Además, se estima la ingesta de GG en los lactantes alimentados con estos preparados.

## Material y métodos

### Reactivos

La acetona, el ácido clorhídrico fumante (HCl), el cloroformo, el cloruro potásico y el metanol se obtienen de Merck-Millipore (Darmstadt, Alemania). El ácido N-acetilneuramínico (pureza  $\geq 95\%$ ) y el resorcinol (mínimo 99%) se obtienen de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), y el sulfato de cobre (III) pentahidratado es comercializado por Panreac (Barcelona, España). La membrana de diálisis procede de Spectra/Por (MWCO 3500) de Spectrumlabs (Rancho Domínguez, California, Estados Unidos). El agua ultrapura se obtiene mediante un sistema de purificación de agua Millipore-Q (Milford, Massachusetts, Estados Unidos).

La disolución de resorcinol se prepara extemporáneamente con 10 mL de resorcinol al 2% (p/v), 80 mL de HCl fumante, 0,25 mL de sulfato de cobre (III) pentahidratado 0,1 M y 9,75 mL de agua ultrapura.

### Muestras

Se analizan 13 PL de base láctea en polvo comercializados en tres países europeos (España, Suecia y República Checa). La composición y el factor de reconstitución (FR) de todos los preparados en polvo se resumen en la tabla 1.

### Determinación de gangliósidos

Cinco gramos de PL en polvo, por duplicado, se tratan con acetona para eliminar los lípidos neutros. El residuo obtenido se trata con cloroformo:metanol, en distintas proporciones, para extraer los lípidos. A continuación, los GG se extraen mediante partición de Folch, dializando la fracción de GG en agua destilada a 4 °C durante 48 horas. El dializado se liofiliza, se resuspende en 1 mL de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se centrifuga<sup>11</sup>.

El contenido total de GG se determina, como ASUL, por espectrofotometría del visible con resorcinol<sup>21</sup>. En resumen, 10  $\mu$ L del sobrenadante del extracto de GG se evaporan a sequedad. Se añaden 500  $\mu$ L de agua ultrapura y 500  $\mu$ L de reactivo resorcinol. Se calientan durante 15 minutos a 100 °C en un bloque calefactor. Una vez enfriado, se añade 1 mL de alcohol amílico, se agita vigorosamente y se centrifuga (1.000  $\times$  g, 10 min, 4 °C). Se realiza la determinación espectrofotométrica (Lambda 2, Perkin-Elmer) a 580 nm en la fase orgánica frente a un blanco de alcohol isoamílico. Paralelamente, se preparan blancos y disoluciones patrón con 5, 10 y 15  $\mu$ g de ácido N-acetilneuramínico.

### Estimación de ingestas

Se calcula la ingesta diaria (mg/día) durante los primeros 6 meses de vida del lactante, con los volúmenes medios de PL ingeridos por un total de 1.113 recién nacidos a término, sanos y alimentados con PL, de acuerdo con Claumarchirant et al.<sup>17</sup>.

TABLA 1

## Ingredientes de los preparados para lactantes (PL) analizados y factor de reconstitución

País	PL	Ingredientes	FR (% p/v)	S:C
España	1	Lactosa, lípidos lácteos, maltodextrina, leche desnatada, aceites vegetales (colza, girasol, girasol con oleico), proteínas del suero lácteo, aceite de pescado (DHA), aceite de <i>Mortierella alpina</i> (ARA), emulsionantes (lecitina de soja), vitaminas, cloruro de colina, antioxidantes, taurina, fermentos lácteos	13,5	68:32
	2	Suero lácteo desmineralizado, leche desnatada, aceites vegetales (palma, colza, coco, girasol y aceite de <i>Mortierella alpina</i> ), lactosa, minerales, aceite de pescado, lecitina de soja, vitaminas, nucleótidos, proteínas de la leche, bifidobacterias	12,9	70:30
	3	Leche desnatada, lactosa, aceites vegetales (palma, semilla de palma, colza, girasol, girasol alto oleico, de alga [ARA]), FOS, proteína del suero enriquecida con alfa-lactoalbúmina, maltodextrina, sales minerales, emulsionante (lecitina de soja), aceite de pescado (fuente de DHA), vitaminas, nucleótidos, antioxidantes	13,5	60:40
	4	Lactosa, aceites vegetales (palma, coco, colza, girasol alto oleico y de girasol), leche desnatada, proteínas del suero, GOS, maltodextrina, minerales, lecitinas, aceites de hongos y algas, vitaminas, nucleótidos	12,9	60:40
	5	Lactosa, aceites vegetales (girasol, colza, palma, coco, aceite unicelular), leche desnatada, GOS, grasa láctea, proteína del suero enriquecida en MFGM, proteína del suero enriquecida en alfa-lactoalbúmina, minerales, lecitina de soja, aceite de pescado, aceites de hongos, vitaminas, nucleótidos, cloruro de colina, inositol, carnitina	13,0	62:38
	6	Lactosa, aceites vegetales (girasol, colza, palma, coco, aceite unicelular), leche desnatada, grasa láctea, proteína del suero enriquecida en MFGM, proteína del suero enriquecida en alfa-lactoalbúmina, proteínas de la leche, vitaminas, aceite de pescado, aceites de hongos y algas, emulgente (lecitina de soja), minerales, cloruro de colina, taurina	11,4	71:29
Suecia	7	Suero lácteo, lactosa, leche desnatada, aceite vegetal (palma, canola, coco, girasol), proteínas de la leche en polvo, maltodextrina, aceite de pescado, emulsionante, aceite de <i>Mortierella alpina</i> , lecitina de soja, sales minerales, vitaminas, cultivos de bifidobacterias	12,9	70:30
	8	Leche desnatada orgánica, suero orgánico desmineralizado en polvo, aceites orgánicos vegetales (palma, colza, girasol), GOS, lactosa, aceites poliinsaturados (pescado y vegetales), minerales, emulgente, vitaminas, estabilizador (ácido láctico)	13,0	70:30
	9	Lactosa, aceites vegetales (girasol, colza, palma, coco, aceite unicelular), leche desnatada, GOS, grasa láctea, proteína del suero enriquecida en MFGM, proteína del suero enriquecida en alfa-lactoalbúmina, minerales, lecitina de soja, aceite de pescado y hongos, vitaminas, taurina, nucleótidos, cloruro de colina, inositol, carnitina	13,0	62:38
República Checa	10	Suero desmineralizado en polvo, aceites vegetales, suero lácteo en polvo, lactosa, leche desnatada en polvo, GOS, minerales, vitaminas, colina, emulgente (lecitina)	12,9	66:34
	11	Suero desmineralizado, aceites vegetales (palma, colza, girasol, coco, microbiológicos [ARA]), lactosa, leche, FOS, GOS, minerales, vitaminas, lecitina de soja, aceites de pescado	13,5	60:40
	12	Suero desmineralizado (de leche), aceite vegetal, lactosa, leche desnatada, GOS, proteína del suero concentrado (de leche), FOS, aceite de pescado, minerales, vitaminas, nucleótidos, lecitina de soja	13,5	60:40
	13	Suero hidrolizado, aceites vegetales (palma, colza, coco, girasol, aceites de fuentes microbianas [ARA]), lactosa, leche desnatada en polvo, GOS, FOS, suero lácteo concentrado, minerales, vitaminas, lecitina de soja	13,8	50:50

ARA: ácido araquidónico; DHA: ácido docosahexaenoico; FOS: fructooligosacáridos; FR: factor de reconstitución; GOS: galactooligosacáridos; S:C: ratio seroproteína:caseína.

### Análisis estadístico

Para evaluar las posibles diferencias entre los contenidos de GG en los PL, se aplica un análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). El ANOVA de dos factores (periodo de lactancia y tipo de PL) y el test de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ) se aplican a los valores medios de ingesta de GG. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus, versión 5.1 (Rockville, Maryland, Estados Unidos).

## Resultados y discusión

### Contenidos

En la tabla 2 se muestran los contenidos de grasa y GG totales de los PL analizados. Los PL sin MFGM en su formulación presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en

sus contenidos de GG, y estos contenidos oscilan entre 0,30 (PL-1) y 1,30 (PL-7) mg de ASUL/L, situándose dentro del intervalo proporcionado por algunos autores (0,5-2,9 mg de ASUL/L) (tabla 2).

A fin de poder comparar los resultados obtenidos con los trabajos más recientes, los resultados se expresan en mg de GG por 100 g o L de PL; se trata de una aproximación, ya que se utiliza uno de los posibles pesos moleculares del GG mayoritario ( $GD_3$ ). Se obtienen contenidos de GG inferiores a los indicados en la bibliografía, excepto para el PL-6 enriquecido con MFGM, que se sitúa dentro del intervalo. Este hecho puede deberse a las técnicas de masas utilizadas (LC/ESI-MS/MS, UPLC-ESI-MS/MS, HPLC-LTO-MS), que permiten cuantificar los GG de manera directa<sup>12-14</sup>, así como a la diversidad de ingredientes empleados en la formulación de los PL.

**TABLA 2**
**Contenido de grasa y gangliósidos totales en los preparados para lactantes (PL) analizados**

PL	Grasa (% p/p)	mg de ASUL/100 g	mg de ASUL/L*	mg GG/100 g**	mg GG/L**
1	22,2 ± 2,1	0,22 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,09	0,57 ± 0,17	0,77 ± 0,23
2	25,5 ± 1,0	0,84 ± 0,22 <sup>b,c</sup>	1,08 ± 0,28	2,13 ± 0,55	2,75 ± 0,71
3	23,7 ± 0,3	0,58 ± 0,03 <sup>b,d</sup>	0,78 ± 0,04	1,48 ± 0,07	2,00 ± 0,09
4	25,3 ± 0,8	0,40 ± 0,03 <sup>a,d,e</sup>	0,52 ± 0,04	1,02 ± 0,08	1,32 ± 0,10
5	27,2 ± 0,6	1,17 ± 0,12 <sup>f</sup>	1,52 ± 0,15	2,99 ± 0,30	3,88 ± 0,39
6	34,8 ± 0,7	2,36 ± 0,12 <sup>g</sup>	2,69 ± 0,13	6,01 ± 0,30	6,86 ± 0,34
7	25,8 ± 0,1	1,01 ± 0,09 <sup>c,f</sup>	1,30 ± 0,13	2,57 ± 0,25	3,32 ± 0,33
8	23,2 ± 0,6	0,30 ± 0,03 <sup>a,e</sup>	0,39 ± 0,04	0,76 ± 0,08	0,99 ± 0,11
9	27,7 ± 2,2	0,95 ± 0,20 <sup>c,f</sup>	1,23 ± 0,26	2,42 ± 0,52	3,15 ± 0,67
10	22,4 ± 2,0	0,59 ± 0,00 <sup>b,d,e</sup>	0,77 ± 0,00	1,52 ± 0,00	1,95 ± 0,00
11	22,3 ± 2,6	0,23 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,05	0,59 ± 0,10	0,80 ± 0,13
12	24,3 ± 0,4	0,30 ± 0,01 <sup>a,e</sup>	0,41 ± 0,02	0,77 ± 0,04	1,04 ± 0,05
13	21,4 ± 0,5	0,75 ± 0,07 <sup>b,c</sup>	1,04 ± 0,12	1,93 ± 0,22	2,66 ± 0,31
Datos de la bibliografía			0,50-6,20 <sup>3,8-11</sup>	3,47-18,88 <sup>13,14</sup>	4,96-11,42 <sup>12</sup>

Resultados expresados como media ± desviación estándar de cuatro réplicas procedentes de un mismo lote. Diferente letra en la misma columna indica una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los distintos preparados para lactantes. Test de Tukey HSD. \*Calculado utilizando el factor de reconstitución de cada preparado. \*\*Convertidos a mg de GG utilizando el peso molecular del ácido siálico (309 g/mol) y del GG mayoritario de los preparados para lactantes: GD3 (1.577 g/mol). ASUL: ácido siálico unido a lípidos; GG: gangliósidos.

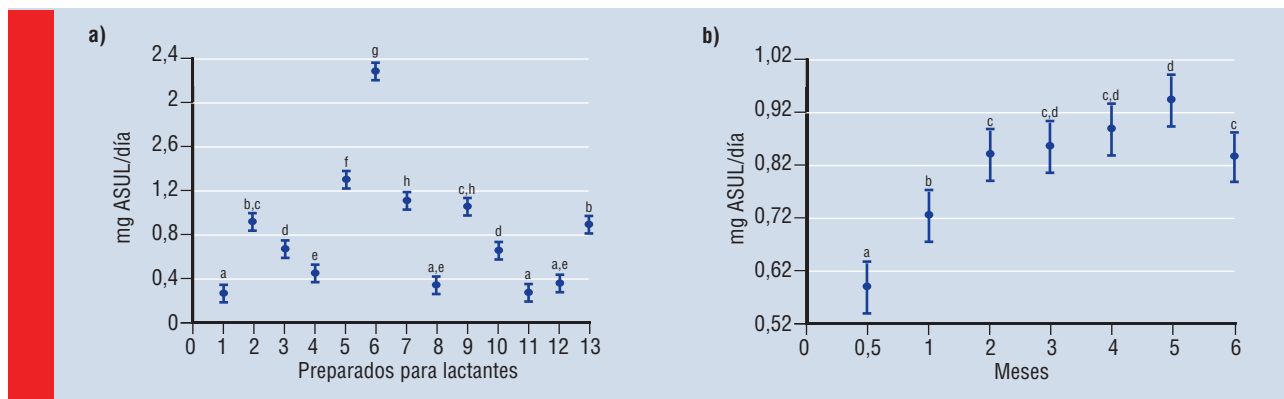
En relación con este último factor, Neeser et al.<sup>8</sup> obtienen un amplio intervalo de contenido de GG (0,5-6,2 mg de ASUL/L) en PL formulados con distintos ingredientes proteicos (caseína, leche entera o desnatada, caseinato potásico, concentrado proteico del suero, proteína hidrolizada y suero desmineralizado en polvo) y lipídicos (grasa láctea, aceite de maíz, mezcla de aceites vegetales), así como una composición diferente (relación seroproteínas:caseínas, grasa láctea:grasa vegetal y lactosa:maltodextrinas). La variabilidad en los contenidos de GG en los PL podría deberse a la diversidad, procedencia y forma de obtención de los ingredientes utilizados en su elaboración, un factor ya indicado en la bibliografía<sup>8,9</sup>. En este sentido, los concentrados de proteínas del suero son ingredientes que se obtienen después de homogeneizar la leche de vaca, un proceso que disgrega y dispersa la MFGM; por tanto, los GG de esta fracción pueden migrar a diferentes fracciones que puedan formarse, como nata, leche desnatada y componentes no grasos o del suero, proporcionando un contenido variable de GG a los PL cuando se emplean estos ingredientes en la formulación<sup>8</sup>. En la bibliografía se señala que adicionar suero proteico al PL, independientemente de que el ingrediente usado sea suero en polvo desmineralizado o concentrado de proteína del suero, proporciona altas cantidades de GG (3,2-6,2 mg de ASUL/L)<sup>8</sup>.

Los PL suplementados con MFGM (5, 6 y 9) presentan mayores contenidos de GG (1,23-2,69 mg de ASUL/L), el PL-6 significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) al PL-5 y al PL-9 (tabla 2).

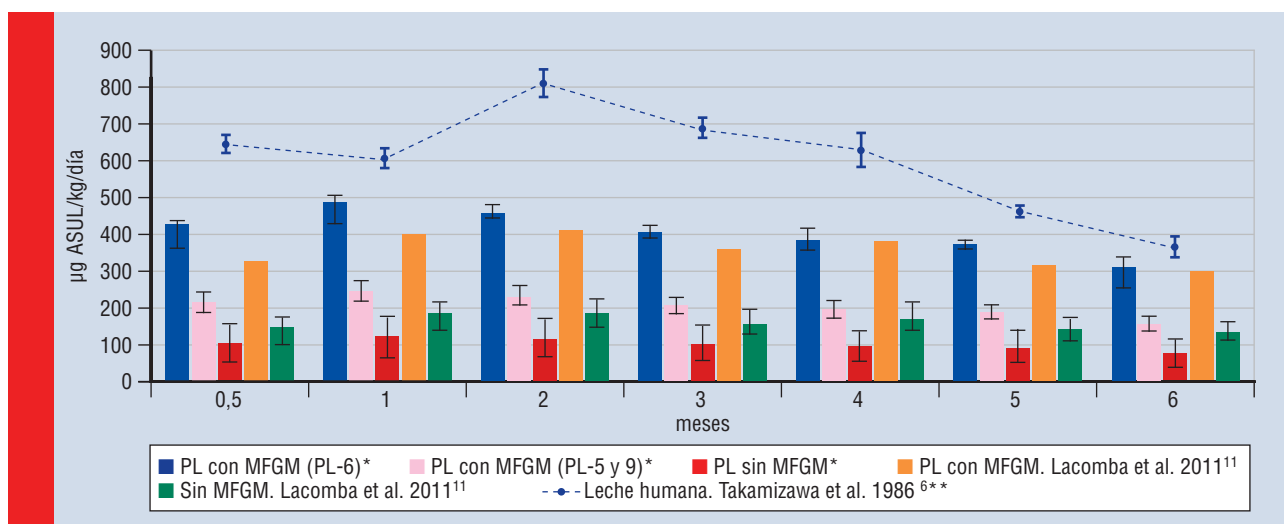
Este hecho sólo se justificaría por la utilización de una menor cantidad de MFGM o ingrediente graso y/o proteico en la formulación de los PL-5 y PL-9. A pesar de las diferencias en la naturaleza de la grasa de los PL respecto a las fracciones grasas lácteas usadas como ingrediente, esta relación directa entre contenidos de grasa y GG ha sido indicada para la leche de otras especies de mamíferos<sup>22</sup>. Al respecto existen distintos ingredientes de MFGM comercializados y patentados que presentan contenidos de GG de 0,2 y 2 g/100 g. Otros ingredientes que también aportarían contenidos de GG serían el suero lácteo (64-85 mg/100 g), el beta-suero (314-420 mg/100 g) o ingrediente a base de lípidos polares (1.544-1.657 mg/100 g)<sup>13</sup>. Cabe destacar que el PL-7 tiene un contenido equiparable a éstos, sin que se haya encontrado relación alguna con sus ingredientes.

Al igual que en nuestro estudio, los mayores contenidos de GG en los PL indicados en la bibliografía corresponden a los que adicionan MFGM, en forma de concentrado de proteínas del suero enriquecido con MFGM (2,29 mg de ASUL/L de PL)<sup>11</sup> o un derivado de la MFGM (de origen bovino) que también contiene otros compuestos bioactivos como fosfolípidos y ácidos grasos (9 mg GG/100 g de PL)<sup>23</sup>.

Sólo el PL-6 se aproximaría al contenido de GG que proporciona la LH (2,3 mg de ASUL/L)<sup>11</sup>. Ninguno de los PL de este estudio alcanzaría los niveles de GG de la LH señalados por Iwamori et al.<sup>7</sup> (3,12-7,23 mg de ASUL/L). En general, el PL con mayor con-



**Figura 1.** Ingesta media de gangliósidos totales. Diferente letra indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos preparados para lactantes (a) y entre los diferentes periodos de lactancia (b)



**Figura 2.** Ingestas medias de gangliósidos totales en preparados para lactantes (PL) con o sin membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) analizados en este estudio, comparadas con las obtenidas por Lacomba et al.<sup>11</sup> y con las calculadas para leche humana a partir de datos de Takamizawa et al.<sup>6</sup>. \*Calculado utilizando el percentil 50 del peso corporal de recién nacidos, niños y niñas (OMS, 2006)<sup>24</sup>. \*\*Ingestas calculadas

tenido de GG (PL-6) proporciona entre 1,2 y 1,9 veces menos de GG que la LH madura (3,12-4,82 mg de ASUL/L)<sup>7</sup>. Esta variabilidad respecto a los contenidos de GG en la LH se debe a que la LH es un fluido muy heterogéneo, cuya composición se ve influida por el periodo de lactancia, la dieta materna, la situación geográfica y el sexo del lactante, entre otros factores.

### Estimación de ingestas

Independientemente del mes de lactancia, la ingesta media de GG oscila de 0,3 a 2,3 mg de ASUL/día, observándose ingestas significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) para los PL (5 y 6) que llevan adicionada MFGM (figura 1a).

Si se consideran los distintos periodos de lactancia, con independencia del PL (figura 1b) se produce un incremento en la ingesta de GG estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) desde los 0,5 hasta los 2 meses (desde 0,58 a 0,83 mg de ASUL/día);

los niveles se mantienen constantes hasta el quinto mes (0,83-0,94 mg de ASUL/día), a partir del cual se produce un descenso estadísticamente significativo (0,82 mg de ASUL/día).

Las menores ingestas de GG en los primeros días de vida (0,5 meses) están relacionadas con la capacidad reducida del estómago del lactante, que determina que el volumen de PL ingerido sea menor. Por otro lado, la disminución de ingesta de GG a los 6 meses se ve compensada por la introducción de la alimentación complementaria.

En la figura 2 se muestran las ingestas de GG a partir de PL con y sin adición de MFGM analizados en este estudio, y se comparan con las obtenidas en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación para tres PL (agrupados con o sin MFGM)<sup>11</sup> y con las calculadas a partir de los contenidos de LH procedentes de otro estudio<sup>6</sup>.

El PL-6, con adición de MFGM, es el que mayores ingestas de GG proporciona, superiores a las de Lacomba et al.<sup>11</sup>, excepto en el cuarto y sexto mes (figura 2). Estas diferencias pueden atribuirse no sólo al mayor contenido de GG en el PL-6, sino a la estimación de un menor volumen de PL ingerido por el lactante en nuestro estudio, calculado a partir de volúmenes reales ingeridos por el lactante obtenidos de una revisión bibliográfica, respecto al recomendado por el fabricante en la etiqueta utilizado por Lacomba et al.<sup>11</sup>

Se observa que las ingestas de GG proporcionadas por los PL (34,5-477 µg de ASUL/kg/día) son inferiores a las calculadas para la LH (359-795 µg de ASUL/kg/día)<sup>6</sup>. La máxima diferencia entre las ingestas aportadas por los PL y la LH corresponde al segundo mes de lactancia y la mínima al sexto mes, en que el PL-6 incluso las iguala (figura 2). Se constata que sólo las ingestas proporcionadas por el PL-6 igualarían o superarían las de la LH calculadas por Lacomba et al.<sup>11</sup> (293 µg de ASUL/kg/día) a partir de un *pool* de LH (4-7 meses de lactancia). Los demás PL únicamente alcanzarían entre el 27 y el 83% de las ingestas de GG proporcionadas por la LH. Porcentajes superiores a los indicados por Sánchez-Díaz et al.<sup>9</sup> (10-30%).

Dada la implicación de los GG en el desarrollo cerebral, el crecimiento, el sistema inmunitario y la protección frente a algunos enteropatógenos<sup>10</sup>, sería necesario que estas diferencias entre PL y LH llegasen a ser mínimas.

## Conclusiones

La adición a los PL del ingrediente proteínas del suero ricas en MFGM mejoraría los contenidos e ingestas de GG, reduciendo así las diferencias entre los PL y la LH en todo el periodo estudiado (de 0,5 a 6 meses), y especialmente en el sexto mes de la lactancia. Es necesario llevar a cabo más estudios para que los contenidos e ingestas de GG en los PL puedan alcanzar los de la LH. Para ello hay que analizar el contenido de GG en los ingredientes utilizados en la formulación de PL y/o evaluar la influencia de estos ingredientes en los PL.

## Bibliografía

1. 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: 1.024-1.029.
2. Rueda R. The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. *Br J Nutr.* 2007; 98: S68-S73.
3. Laegreid A, Otnaess ABK, Fuglesang J. Human and bovine milk: comparison of ganglioside composition and enterotoxin-inhibitory activity. *Pediatr Res.* 1986; 20: 416-421.
4. Kolter T. Ganglioside biochemistry. *ISRN Biochem.* 2012; 2012: 1-36.
5. Lacomba R, Salcedo J, Alegría A, Lagarda MJ, Barberá R, Matencio E. Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: a review. *J Pharm Biomed Anal.* 2010; 51: 346-357.
6. Takamizawa K, Iwamori M, Mutai M, Nagai Y. Selective changes in gangliosides of human milk during lactation: a molecular indication for the period of lactation. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 879: 73-77.

7. Iwamori M, Takamizawa K, Momoeda M, Iwamori Y, Taketani Y. Gangliosides in human, cow and goat milk, and their abilities as to neutralization of cholera toxin and botulinum type A neurotoxin. *Glycoconj J.* 2008; 25: 675-683.
8. Neeser JR, Golliard M, Del Vedovo S. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. *J Dairy Sci.* 1991; 74: 2.860-2.871.
9. Sánchez-Díaz A, Ruano MJ, Lorente F, Hueso P. A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; 24: 405-410.
10. Pan XL, Izumi T. Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk and infant formulas. *Early Hum Dev.* 2000; 57: 25-31.
11. Lacomba R, Salcedo J, Alegría A, Barberá R, Hueso P, Matencio E, et al. Sialic acid (N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid) and ganglioside in whey protein concentrates and infant formulae. *Int Dairy J.* 2011; 21: 887-895.
12. Sørensen LK. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the determination of gangliosides GD3 and GM3 in bovine milk and infant formulae. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20: 3.625-3.633.
13. Fong B, Norris C, McJarrow P. Liquid chromatography-high-resolution electrostatic ion-trap mass spectrometric analysis of GD3 ganglioside in dairy products. *Int Dairy J.* 2011; 21: 42-47.
14. Zhang J, Ren Y, Huang B, Tao B, Ransborg Pedersen M, Li D. Determination of disialoganglioside GD<sub>3</sub> and monosialoganglioside GM<sub>3</sub> in infant formulas and whey protein concentrates by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2012; 35: 937-946.
15. López C, Cauty C, Guyomarc'h F. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Sci Technol.* 2015; 95: 863-893.
16. Claumarchirant L, Cilla A, Matencio E, Sánchez-Siles LM, Castro-Gómez P, Fontecha J, et al. Addition of milk fat globule membrane as an ingredient of infant formulas for resembling the polar lipids of human milk. *Int Dairy J.* 2016; 61: 228-238.
17. Claumarchirant L, Matencio E, Sánchez-Siles LM, Alegría A, Lagarda MJ. Sterol composition in infant formulas and estimated intake. *J Agric Food Chem.* 2015; 63: 7.245-7.151.
18. Hernell O, Timby N, Domellöf M, Lönnerdal B. Clinical benefits of milk fat globule membranes for infants and children. *J Pediatr.* 2016; 173: S60-S65.
19. Timby N, Domello E, Hernell O, Lo B. Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99: 860-868.
20. Timby N, Hernell O, Vaarala O, Melin M, Lönnerdal B, Domellöf M. Infections in infants fed formula supplemented with bovine milk fat globule membranes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60: 384-389.
21. Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids: II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta.* 1957; 24: 604-611.
22. Puente R, García-Pardo A, Rueda R, Gil A, Hueso P. Seasonal variations in the concentration of gangliosides and sialic acids in milk from different mammalian species. *Int Dairy J.* 1996; 6: 315-322.
23. Gurnida DA, Rowan AM, Idjradinata P, Muchtadi D, Sekarwana N. Association of complex lipids containing gangliosides with cognitive development of 6-month-old infants. *Early Hum Dev.* 2012; 88: 595-601.
24. Organización Mundial de la Salud. Child growth standards. Weight-for-age. Charts of Z-scores of boys and girls. 2006. Disponible en: [http://www.who.int/childgrowth/standards/weight\\_for\\_age/en/](http://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_age/en/) [consultado el 13/11/2016].