

REVISIÓN

Oligosacáridos de la leche materna: evidencia de su funcionalidad en lactantes

C. Martínez-Costa¹, M.C. Collado², M. Sánchez-Luna³, G. Álvarez Calatayud⁴, G. Rodríguez Martínez⁵, M.L. Vidal-Guevara⁶, E. Román Riechmann⁷, J.M. Moreno-Villares⁸

¹Catedrática de Pediatría. Universidad de Valencia. Jefa de Servicio de Pediatría. Hospital Clínico Universitario. Valencia. ²Investigador Científico. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC). Paterna (Valencia). ³Jefe de Servicio de Neonatología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. Profesor titular de Pediatría. Universidad Complutense de Madrid. ⁴Médico adjunto. Sección de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. ⁵FEA de Pediatría. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza. Profesor titular de Pediatría. Universidad de Zaragoza. IIS Aragón. ⁶Medical & Scientific Affairs. Nutrición Infantil. Nestlé España. Barcelona. ⁷Jefa del Departamento de Pediatría. Profesora asociada de Ciencias de la Salud. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid. ⁸Director del Departamento de Pediatría. Clínica Universidad de Navarra. Madrid

Resumen

La leche humana es un fluido muy complejo que contiene numerosos compuestos bioactivos. Entre ellos, incluye concentraciones muy elevadas de oligosacáridos (*human milk oligosaccharides* [HMO]), que agrupan más de un centenar de azúcares complejos. Se presenta una revisión extensa de la composición y las funciones de los HMO, destacando la influencia del genotipo materno FUT2 (fucosiltransferasa 2) en el tipo y la concentración, esta última muy superior en mujeres secretoras FUT. Los HMO no son digeribles en el intestino del lactante, por lo que proporcionan un sustrato para el desarrollo de una microbiota intestinal rica, fundamentalmente en bifidobacterias. Además, como algunos de estos HMO comparten secuencias estructurales con receptores para patógenos intestinales, actúan como señuelo bloqueando estos receptores e impidiendo su adhesión y proliferación. Los beneficios que aporta el consumo de dichos HMO se consideran únicos; por ello, la síntesis de HMO estructuralmente idénticos a los encontrados en la leche materna, con una funcionalidad similar demostrada en diversos estudios clínicos, abre una línea de investigación sumamente interesante en el campo de la nutrición infantil. Se analizan los primeros estudios clínicos realizados con HMO, aunque se considera que es necesario llevar a cabo nuevos ensayos de intervención clínica en lactantes para confirmar dichos efectos sobre el sistema inmunitario y la reducción de la frecuencia de infecciones del tracto respiratorio y gastrointestinal.

©2019 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

Palabras clave

Oligosacáridos, leche materna, prebióticos, microbiota, lactante

Abstract

Title: Human milk oligosaccharides: functionality in infants

Human milk is a very complex fluid that contains numerous bioactive compounds. Among them, it includes very high concentrations of oligosaccharides (human milk oligosaccharides [HMOs]) that group more than a hundred complex sugars. We present an extensive review of the composition and functions of the HMOs, highlighting the influence of the maternal genotype FUT2 on the type and concentration, being the latter much higher in FUT secretory women. The HMOs are non digestible in the intestine of the infant, therefore, they provide a substrate for the development of an intestinal microbiota, mainly rich in bifidobacteria. In addition, since some of these HMOs share some structural sequences with receptors for intestinal pathogens, they act as decoy blocking these receptors preventing their adhesion and proliferation. The benefits of the consumption of these HMOs are considered unique, therefore the synthesis of HMOs structurally identical to those found in breast milk and with similar functionality demonstrated through clinical studies, opens a very interesting line of research in the field of infant nutrition. The first clinical studies conducted with HMOs are analyzed, considering necessary new clinical intervention trials in infants to confirm these effects on the immune system and reducing the frequency of respiratory and gastrointestinal infections.

©2019 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

Keywords

Oligosaccharides, human milk, probiotics, microbiota, infant

Introducción

La leche materna constituye la alimentación idónea para el recién nacido y el lactante, no sólo por su composición nutricional sino también por sus componentes bioactivos (inmunoglobulinas complemento, células, citocinas, factores de crecimiento, lactoferrina, lactadherina, lisozima, mucina, oligosacáridos, enzimas y diversas sustancias con efectos antioxidantes), que le confieren protección frente a enfermedades a corto y largo plazo¹⁻³.

Numerosos trabajos sustentan que las infecciones gastrointestinales y respiratorias en el lactante alimentado con leche materna son menos frecuentes y con un menor índice de complicaciones que en los alimentados con una fórmula infantil. Además, la lactancia materna ha demostrado su beneficio en los recién nacidos pretérmino, en los que se considera un factor protector principal frente a ciertas enfermedades, como la enterocolitis necrosante y la sepsis neonatal⁴⁻⁷. Al favorecer y modular el desarrollo inmunológico del lactante, la lactancia materna se ha relacionado también con una menor frecuencia de enfermedades alérgicas y autoinmunes. A medio-largo plazo, los estudios epidemiológicos de seguimiento sugieren que la lactancia materna previene, además, el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no comunicables, como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, etc.^{8,9}. En la madre, la lactancia contribuye a su salud y bienestar, ayuda a espaciar los embarazos, favorece la mineralización ósea y el ahorro de hierro, además de reducir el riesgo de cáncer de ovario y mama⁷.

La leche humana, a diferencia de la leche de la mayoría del resto de los mamíferos, contiene concentraciones muy elevadas de oligosacáridos (*human milk oligosaccharides* [HMO]), que agrupan más de un centenar de azúcares complejos. La composición de los HMO sigue un modelo básico, aunque cada

mujer tiene un perfil propio de HMO. Además, las concentraciones varían entre distintas madres y en la misma a lo largo de la lactancia. Estas diferencias inter/intraindividuales en la composición de los HMO están, en parte, determinadas por factores genéticos¹⁰.

El estudio de la microbiota del recién nacido y del lactante ha adquirido mucha importancia por su implicación en su salud a corto y largo plazo^{11,12}. En este sentido, los HMO actúan como prebióticos «específicos», favoreciendo el crecimiento de la microbiota intestinal beneficiosa en el lactante. Pero la leche materna también contiene bacterias que contribuyen de forma significativa al desarrollo y la colonización intestinal en los neonatos. Tanto las bacterias como los HMO presentes en la leche materna constituyen un factor principal en su papel protector, ya que ambos modulan la colonización intestinal y, con ello, la respuesta inmune. Se han publicado numerosos estudios que han investigado la actividad antibacteriana local frente a bacterias enteropatógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., toxinas de cólera y *Shigella* spp.) y frente a rotavirus y norovirus^{13,14}.

Contenido en oligosacáridos de la leche humana

La leche humana contiene un complejo heterogéneo de sustancias, como aminoácidos, vitaminas, minerales e hidratos de carbono, principalmente HMO, que facilitan el desarrollo de la microbiota intestinal durante la lactancia¹⁵. Los hidratos de carbono (en concentraciones promedio de 55-70 g/L) están constituidos por lactosa mayoritariamente y por HMO, cuya concentración es variable, aproximadamente 5-15 g/L^{16,17}. Cuantitativamente, los HMO son el tercer mayor componente de la leche humana, sólo

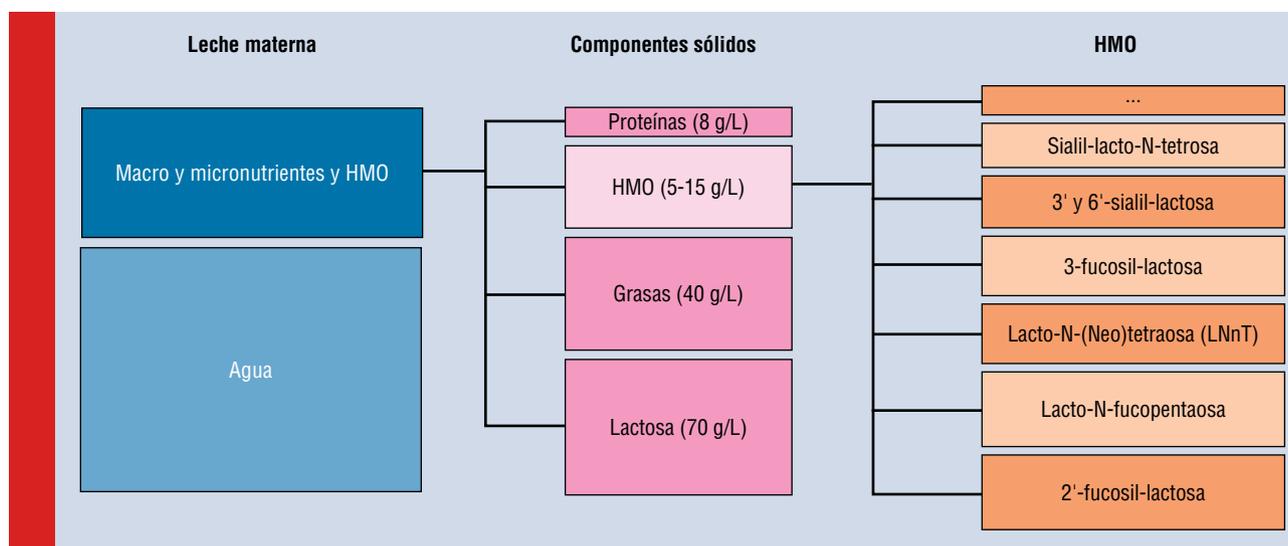


Figura 1. Los oligosacáridos (HMO) de la leche materna representan el tercer mayor componente sólido en ésta. (Adaptada de: Zivkovic et al., PNAS²¹)

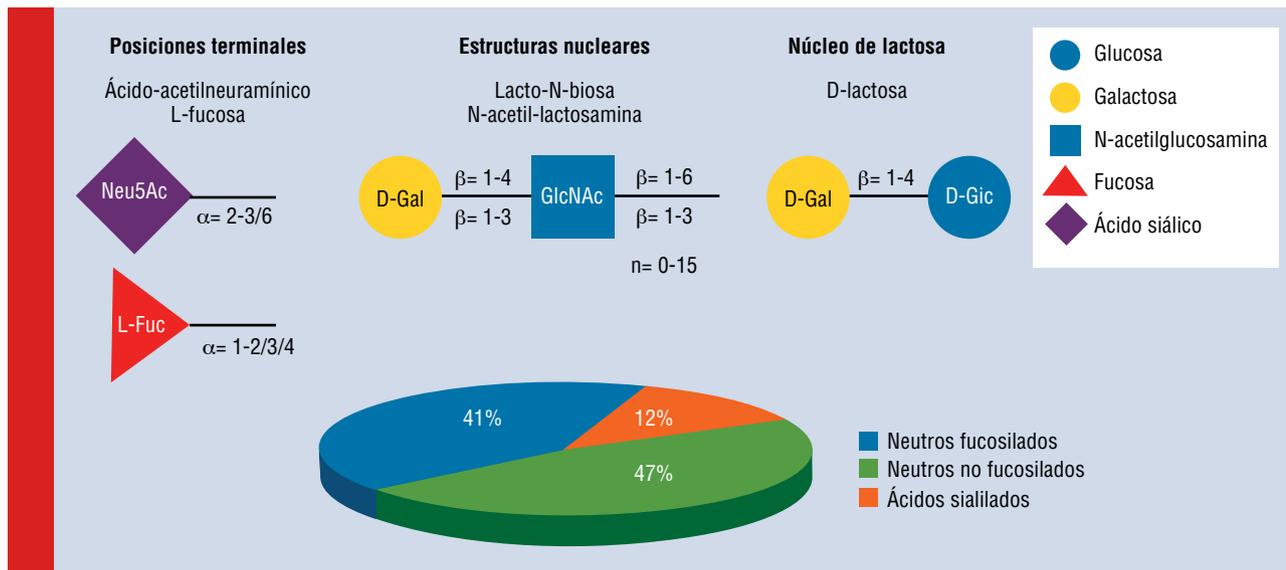


Figura 2. Características estructurales generales comunes de los oligosacáridos (HMO) de la leche materna. (Adaptada de: Bode^{14,15,26}). Porcentaje de HMO neutros y ácidos sobre el total en la leche materna. (Adaptada de: Smilowitz et al.²⁷)

por detrás de la lactosa y de los lípidos, con cifras próximas a las del componente proteico (figura 1). Esta concentración es superior a la encontrada en leche de otros mamíferos. Por ejemplo, la leche de vaca contiene sólo 1 g/L de estos hidratos de carbono. Por otro lado, la composición de HMO es variable en la leche materna; el calostro es el que posee los mayores niveles, con una concentración de hasta 22-24 g/L¹⁸⁻²⁰.

La fracción que constituye los HMO es muy compleja si se compara con la leche del resto de los mamíferos, ya que está formada por, al menos, 1.000 componentes, la gran mayoría de ellos en cantidades muy bajas. Hasta el momento, se han identificado más de 200 HMO con diferentes grados de polimerización (entre 3 y 15 monómeros). Cerca de la mitad ya han sido caracterizados estructuralmente.

Estos HMO se han considerado los primeros prebióticos, ya que se ha comprobado que son los responsables del alto número de bifidobacterias presentes en el intestino de los lactantes. Por ese motivo, también se les conoce como «factor bifidogénico», término acuñado por Gauhe et al., que demostraron hace más de 50 años que la N-acetilglucosamina favorecía el crecimiento de las bifidobacterias²¹. Además, se especula que al formar glicoconjugados (con estructura similar a la de los receptores bacterianos), los HMO actuarían como «cebo» de patógenos en la luz intestinal, interfiriendo en su unión a los receptores epiteliales e imposibilitando la infección^{22,23}. Este comportamiento biológico está influido en gran medida por el grupo sanguíneo Lewis y por el estado secretor FUT2 (fucosiltransferasa 2) de cada mujer. Las mujeres no secretoras tendrán una concentración y una composición distintas de HMO y, por ello, la protección frente a infecciones intestinales también resultará diferente¹⁷.

Tanto la composición como el número de HMO presentes en la leche materna son individuales y únicos e, incluso, varían en una misma madre a lo largo de la lactancia. Además de los factores genéticos relacionados con el estado secretor/no secretor, se ha observado que la leche de las madres con hijos prematuros contiene concentraciones más elevadas de HMO. Los niveles elevados de HMO también se han relacionado de forma directamente proporcional con el índice de masa corporal (IMC) materno²⁴.

Estructura de los oligosacáridos de la leche humana

La síntesis de HMO se produce en la glándula mamaria y depende tanto de factores genéticos como ambientales. Los HMO están constituidos, principalmente, por una molécula de lactosa en su extremo reductor a la que, mediante la acción de diferentes glicosiltransferasas, se unen distintos hidratos de carbono. De este modo, todos los HMO siguen la misma configuración molecular: un monosacárido (D-glucosa, D-galactosa, L-fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico) y un disacárido (lactosa). Las moléculas más sencillas (HMO de cadena corta) son trisacáridos (3'-sialilactosa, 6'-sialilactosa, 2'-fucosilactosa y 3'-fucosilactosa), y las más complejas tienen hasta 15 monosacáridos unidos. Los HMO pueden dividirse en 2 grupos: neutros y ácidos. Los HMO neutros están compuestos de glucosa y galactosa (como los galactooligosacáridos [GOS]), pero la gran diferencia es que contienen varias unidades de N-acetilglucosamina y fucosa. Los HMO ácidos contienen, además de los hidratos de carbono mencionados anteriormente, unidades de ácido N-acetilneuramínico, también conocido como ácido siálico (figura 2)^{14,15,25-27}.

La presencia de ácido siálico y fucosa en posición terminal convierte a estos HMO en no digeribles por las enzimas

digestivas y, por tanto, llegan intactos al colon, donde son metabolizados por la microbiota intestinal. Además, los HMO que contienen fucosa y ácido siálico comparten estructuras con los glicanos (mucina) del epitelio intestinal de lactantes. Estos glicanos son receptores de patógenos, por lo que la presencia de estos HMO supone un mecanismo de defensa²⁸.

Estados secretor y no secretor FUT2 de las mujeres lactantes

La adición de fucosa a los HMO (fucosilación) está relacionada con los grupos sanguíneos de Lewis de la madre lactante. De este modo, mediante la enzima fucosiltransferasa 2 (FUT2) se cataliza la unión de fucosa en posición alfa 1-2, propia del 70% de las mujeres caucásicas (secretoras) y contiene altas concentraciones de HMO alfa 1-2 fucosilados (2'-fucosilactosa y lacto-N-fucopentosa). En cambio, las mujeres no secretoras tienen bajas concentraciones de estos HMO. La enzima fucosiltransferasa 3 (FUT3) cataliza la unión de fucosa en posición alfa 1-3/4 y es inactiva en parte de la población (Lewis -); la leche de estas mujeres tiene bajas concentraciones de estos HMO alfa 1-3/4 fucosilados.

Así, en función de la expresión de estas 2 enzimas (FUT2 y FUT3), podemos clasificar a las mujeres lactantes en 4 grupos, cuya composición de oligosacáridos en la leche varía significativamente²⁹.

1. Lewis +/secretoras (Le+/Se+): FUT3 activa, FUT2 activa.
2. Lewis -/secretoras (Le-/Se+): FUT3 inactiva, FUT2 activa.
3. Lewis +/no secretoras (Le+/Se-): FUT3 activa, FUT2 inactiva.
4. Lewis -/no secretoras (Le-/Se-): FUT3 inactiva, FUT2 inactiva.

Existen indicios de que el estado secretor/no secretor puede influir en la salud. Por ejemplo, se ha observado que los prematuros con un perfil bajo secretor o no secretor son más propensos a padecer enterocolitis necrosante³⁰. También se ha comprobado que las madres Le+/Se+ tienen menor riesgo de sufrir mastitis durante la lactancia.

En un estudio recientemente publicado se ha analizado la composición en HMO de muestras de leche materna obtenida de mujeres españolas, y se identificaron 16 de los más abundantes, que constituían un total de 5-10 g/L. Se han constatado, además, diferencias significativas entre la leche de madres FUT secretoras y no secretoras, cuyo contenido en las primeras era significativamente superior (media de 10 g/L, frente a 5 g/L en no secretoras). Por otra parte, hubo diferencias entre los HMO identificados en muestras de leche de mujeres secretoras frente a no secretoras, de modo que los HMO lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-fucopentosa (LNFP) II constituyeron más del 55% del total de los HMO identificados en el grupo Lewis a+b+ no secretor, mientras que la LNT junto con la 2'-fucosil-lactosa LNFP I y la difucosil-lactosa supusieron el 60% en el grupo Lewis a+b+ secretor. En los secretores Lewis a-b-, el 80% lo constituyeron la LNT, 2'-fucosil-lactosa y la LNFP I¹⁷.

Funciones de los oligosacáridos en el organismo del lactante

En la figura 3 se observan las principales funciones de los HMO en los lactantes²⁶.

Factor bifidogénico

Los HMO son resistentes al ácido del estómago y a la hidrólisis de las enzimas pancreáticas, absorbiéndose sólo un pequeño porcentaje en el intestino delgado y llegando en gran cantidad al intestino grueso, donde actúan como sustratos metabólicos para las bacterias colónicas, sobre todo bifidobacterias. Actuarían como prebióticos naturales, al estimular el crecimiento y la actividad de las bacterias intestinales, con los consiguientes beneficios para la salud del lactante³¹. Las bifidobacterias son el género que más se beneficia del efecto causado por los HMO y, por ese motivo, denominamos los HMO «factor bifidogénico»²¹ aunque, en realidad, no todas las especies y cepas de bifidobacterias pueden utilizar los HMO para su crecimiento³². Las especies del género *Lactobacillus*, por ejemplo, no suelen aprovecharse de los HMO, aunque hay excepciones, al igual que otras especies presentes en la microbiota intestinal del lactante, como *Bacteroides fragilis* o *Bacteroides vulgatus*. Otro de los beneficios de los HMO es que impiden el crecimiento de bacterias intestinales potencialmente patógenas, como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *E. coli* o *Propionibacterium* 2³³.

Efecto antimicrobiano

Seguramente, la segunda función claramente establecida de los HMO –y claramente diferenciadora frente a otros prebióticos– sea evitar la adhesión de patógenos a las células epiteliales. La presencia de estas estructuras en la leche materna implica una doble función defensiva: bloqueo de los receptores para los patógenos y creación de un medio que inhibe su proliferación¹⁹.

Se estima que los HMO pueden actuar como antimicrobianos inhibiendo directamente la adhesión de los microorganismos patógenos a las superficies epiteliales celulares, y evitando o reduciendo las enfermedades infecciosas del lactante, sobre todo gastrointestinales. Además, los HMO pueden modificar las respuestas de las células inmunitarias y disminuir el riesgo de desarrollar alergias y otros trastornos inmunológicos^{26,27,34}. Teniendo en cuenta que la estructura química de los HMO (mucina o glicolípidos) es similar a la de los glicanos de la superficie de las células epiteliales, podrían actuar como receptores de transporte de bacterias y virus que suelen emplear lectinas y otras proteínas para atacar a las células. Con ello se evitarían la colonización y la invasión de los agentes infecciosos³⁵.

Por otro lado, tanto los HMO como los ácidos orgánicos de cadena corta generados por su catabolismo (acético, propiónico y butírico) producen un descenso del pH, controlando así el desarrollo de microorganismos que pueden ser perjudiciales. Además, estos ácidos incrementan la presión osmótica lumi-

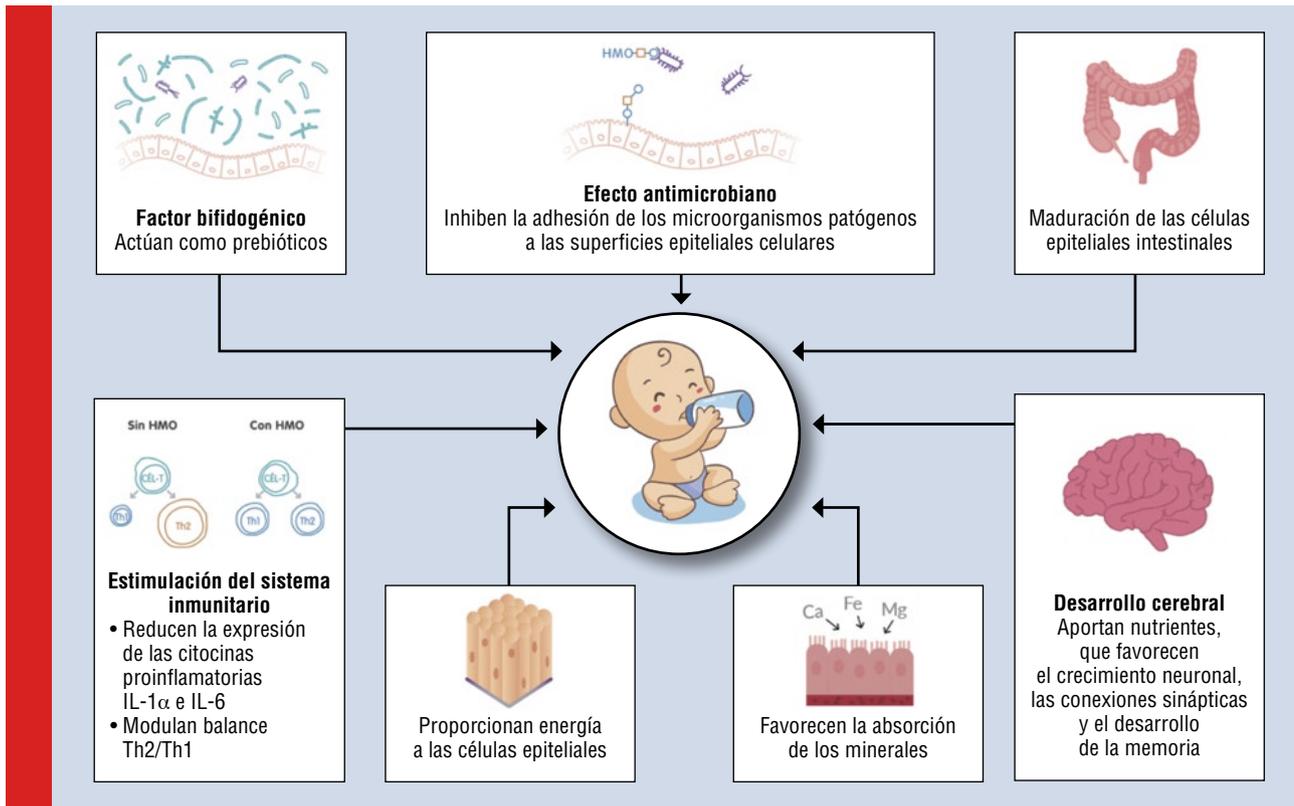


Figura 3. Funciones de los oligosacáridos en el organismo del lactante. (Adaptada de: Bode²⁶)

nal, induciendo la secreción de agua y aumentando el peristaltismo, lo que favorece el tránsito intestinal.

Influencia en el desarrollo cerebral

La suplementación con nutrientes para un adecuado desarrollo cerebral es fundamental en los recién nacidos, sobre todo en los pretérmino. El ácido siálico es una molécula esencial para la síntesis de los gangliósidos y glicoproteínas cerebrales que desempeñan un papel muy importante en el crecimiento neuronal, las conexiones sinápticas y el desarrollo de la memoria³⁶. La concentración de ácido siálico depende tanto de los factores genéticos como de los factores dietéticos, y alcanza un nivel máximo en el calostro de 3,72 mmol/L, para descender a 1,48 mmol/L durante la lactancia.

Estimulación del sistema inmunitario

Se ha observado que los HMO actúan directamente sobre selectinas, integrinas y receptores *Toll-like*. Asimismo, algunos HMO pueden reducir la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 α e IL-6, contribuyendo a la modulación del sistema inmunitario y protegiendo al recién nacido^{37,38}. Seguramente tienen la capacidad de influir en la maduración de los linfocitos y modular tras el nacimiento las respuestas inmunológicas con el balance de los Th2 frente a los Th1, disminuyendo el riesgo de la aparición de alergias.

Absorción de minerales

Los HMO, al fermentar en el colon, dan lugar a ácidos grasos de cadena corta que tienen como misión proporcionar energía a las células epiteliales y favorecer la absorción de minerales, como el calcio, el hierro y el magnesio³⁹. El descenso del pH producido por los ácidos grasos de cadena corta generados por la fermentación de los HMO favorece la absorción de minerales.

Maduración de las células epiteliales intestinales

Aunque son necesarios más estudios para establecer su posible relación, los HMO podrían contribuir directamente al desarrollo del aparato digestivo en los lactantes, al inhibir el crecimiento de varios tipos de células intestinales indiferenciadas mediante dos mecanismos: la supresión del ciclo celular y la regulación de la apoptosis⁴⁰.

Estudios preclínicos y clínicos con 2'-O-fucosil-lactosa (2'FL) y lacto-N-neotetraosa (LNnT)

Características de la 2'FL y de la LNnT

En los últimos años, gracias a los avances tecnológicos, ha sido posible sintetizar HMO, fundamentalmente HMO de peque-

ño tamaño, tri y tetraoligosacáridos, que se encuentran entre los más abundantes en la leche humana.

La síntesis se realiza mediante procedimientos de biofermentación, sin empleo de tecnología que implique modificaciones genéticas. La 2'FL es un trisacárido sintético, consistente en L-fucosa, D-galactosa y D-glucosa, obtenido a partir de L-fucosa y D-lactosa, y similar al contenido, de forma natural, en la leche materna. Está presente en la leche materna en un 80% de las madres (secretoras). El 20% restante no expresan una enzima específica, la α -1,2-fucosiltransferasa, en la glándula mamaria, careciendo por tanto de producción de este HMO⁴¹. Es el más abundante (constituye casi el 37% de todos los HMO), con un rango entre 1,1 y 4,3 g/L en leche madura. De acuerdo con el contenido en 2'FL en la leche materna, se estima que el consumo total diario en lactantes de 0-6 meses no superaría los 2,5 g/día, al constituir la leche su única fuente en la dieta (equivalente a la ingesta de 1.060 mL de fórmula infantil que contuviera 2,4 g/L de 2'FL, aproximadamente 418 mg/kg/día)⁴².

La LNnT es un oligosacárido neutro, presente en la leche materna, derivado de la lacto-N-triosa constituido por D-galactosa, N-acetil-D-glucosamina, D-galactosa y D-glucosa; constituye el 2-3% de todos los HMO, con un rango entre 0,1 y 0,6 g/L. De acuerdo con su contenido en leche materna, se asume que en los lactantes de 0-6 meses su consumo máximo no superaría los 0,9 g/día (aproximadamente 637 mg/día, 104 mg/kg/día para un lactante de 6 kg que consumiera 1.060 mL/día). Se le atribuye un papel en el desarrollo de la microflora intestinal, por constituir un sustrato para la misma, y con acciones también sobre el sistema inmunitario intestinal⁴³. Los niveles más elevados están presentes en los primeros meses de lactancia.

Recientemente, ha sido posible sintetizar ambos oligosacáridos, que representan las categorías de HMO neutros fucosilados y no fucosilados, e incorporarlos a fórmulas para lactantes y preparados de continuación, así como a otros tipos de alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad o, incluso, para individuos adultos.

Estudios preclínicos

Los estudios preclínicos iniciales realizados con HMO se encaminaron a demostrar la seguridad de su empleo, y fue preciso realizarlo en animales de experimentación de acuerdo con los estándares de buena práctica⁴⁴. Los HMO, incluidos los dos estudiados, son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas, tal como se ha observado en ensayos realizados *in vitro*⁴⁵, fermentándose posteriormente en el colon, aunque aproximadamente la mitad de ellos se excretan en las heces sin digerir.

Los estudios de toxicidad han permitido demostrar que su consumo no produce toxicidad (ni directa ni potencial mutagenicidad), cuando se administraban en animales de experimentación, tanto durante cortos periodos como de forma prolongada^{46,47}.

En estos modelos se demostró la capacidad de 2'FL y LNnT de promover el crecimiento de especies de bifidobacterias⁴⁸, así como de disminuir la colonización por *E. coli* enteroinvasiva.

Estudios clínicos

La mayoría de los estudios con exposición en seres humanos a 2'FL y LNnT se limitan fundamentalmente a ensayos observacionales en lactantes amamantados (tabla 1).

En un estudio observacional, Sprenger et al.⁴⁹ analizaron los HMO presentes en muestras de leche humana atendiendo al genotipo secretor valorado a través del contenido en 2'FL. Se encontraron muestras con baja concentración de 2'FL que tenían una elevada concentración de LNT y baja de LNnT, comparadas con las muestras con una elevada 2'FL. Estos autores constataron una disminución durante la lactancia de 2'FL, LNT, LNnT y 6'-sialil-lactosa (6'SL). No se observaron diferencias significativas hasta los 4 meses de edad en las medidas antropométricas (peso, longitud, perímetro cefálico) e IMC⁴⁹.

Existen pocos estudios de intervención realizados en lactantes con fórmulas suplementadas con HMO. Se ha publicado un estudio piloto, sólo como *abstract*, en una muestra de 228 lactantes y niños pequeños (de 6-24 meses) alimentados con una fórmula a base de LNnT, obtenida por fermentación a partir de levaduras, y su influencia en la colonización faríngea por neumococo, que no es válido para evaluar el empleo de ambos HMO en lactantes⁴⁸.

Respecto a la seguridad, en 2 estudios clínicos se ha garantizado el uso de HMO en fórmulas infantiles. En uno de los estudios, realizado por Marriage et al.⁵⁰ en 420 lactantes, se demostraron una tolerancia y un crecimiento similares en niños alimentados con una fórmula suplementada con 2'FL, sin apreciar diferencias significativas en el peso, la longitud o el perímetro craneal. Además, se demostró que la absorción intestinal de 2'FL era similar a la observada en niños alimentados con leche materna.

Los mismos autores investigaron los efectos de dicha fórmula suplementada con 2'FL sobre biomarcadores de la función inmune en niños sanos a término⁵¹. Los niños que recibieron fórmulas suplementadas con 2'FL mostraron un perfil de citocinas estadísticamente diferente del grupo control, alimentado con una fórmula sólo con GOS, pero no distinto del de niños alimentados con leche materna.

Respecto a la influencia sobre la microbiota, en 2 estudios realizados por el mismo grupo^{52,53} se encontró un contenido mayor en bifidobacterias y menor en *Escherichia* y *Peptostreptococcus* spp. en las heces en el grupo que recibió la fórmula estudiada. A los 3 meses, la composición de la microbiota del grupo de estudio se mostró más próxima a la del grupo alimentado con leche materna que a la del grupo control.

El único estudio clínico realizado sobre fórmulas infantiles con más de un HMO se llevó a cabo por el equipo de Puccio et al.⁵⁴, en el que se evaluó una fórmula suplementada con

TABLA 1

Estudios clínicos con HMO

Autor/es (año)	Diseño	Participantes	Respuesta	Comentarios
Sprenger et al. (2016) ⁴⁹	Un centro Estudio observacional Longitudinal (30, 60 y 90 días de lactancia) Determinación de: • HMO • Valoración del genotipo secretor a través de la 2'FL • Valoración antropométrica (peso, longitud, perímetro cefálico e IMC)	n= 50 parejas madre-lactantes (25 niñas y 25 niños)	<ul style="list-style-type: none"> Las muestras con baja concentración de 2'FL (16 pares, 32%) tuvieron una elevada concentración de LNT y baja de LNnT, comparadas con las muestras con elevada 2'FL (34 pares, 68%) Disminución durante la lactancia de 2'FL, LNT, LNnT y 6'SL Sin diferencias significativas hasta los 4 meses de edad en las medidas antropométricas (peso, longitud, perímetro cefálico) e IMC 	Valoración de forma indirecta del genotipo secretor FUT2 a través de la 2'FL
Marriage et al. (2015) ⁵⁰	28 centros de Estados Unidos Estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego Determinación de: • Ganancia de peso durante 4 meses • Mediciones antropométricas • Tolerancia	n= 420 lactantes: 101 recibieron FC, 104 FE1, 109 FE2 y 106 LM • FC: con GOS • FE1: GOS + 2-FL 1 g/L • FE2: GOS + 2-FL 0,2 g/L	<ul style="list-style-type: none"> Sin diferencias significativas en peso, longitud o perímetro cefálico entre los grupos durante el estudio Sin diferencias en las ganancias medias en estas medidas desde el día 14 al 119 Sin diferencias en el volumen diario consumido, con la excepción del periodo comprendido desde el reclutamiento hasta el día 28, durante el cual el grupo FC consumió significativamente más fórmula que el grupo FE1 Número medio de heces por día significativamente mayor para el grupo LM que para los grupos FC, FE1 y FE2 desde el reclutamiento hasta el día 28. Sin diferencias posteriores Sin diferencias en efectos adversos. Absorción y excreción relativa de 2'FL similar entre grupos 	<ul style="list-style-type: none"> Primer estudio de crecimiento y tolerancia de fórmulas infantiles con una densidad calórica similar a la de la leche humana Limitaciones: No se incluyeron lactantes alimentados con fórmula con la densidad calórica estándar, por lo que no se pueden comparar el crecimiento y la ingesta entre los lactantes alimentados con fórmula con la densidad calórica estándar frente a menor
Goehring et al. (2016) ⁵¹	28 centros de Estados Unidos Subestudio aleatorizado del estudio de Marriage et al. ⁵⁰ Determinación de: • Fenotipificación de células sanguíneas • Ciclo celular estimulado por mitógenos <i>ex vivo</i> • Citocinas estimuladas por el VRS • Citocinas estimuladas por fitohemaglutinina <i>ex vivo</i> • Citocinas plasmáticas	n= 315 lactantes desde el día 5 de vida hasta los 4 meses: 75 con FC, 154 FE1 y FE2, y 86 con LM • FC: con GOS • FE1: GOS + 2-FL 1 g/L • FE2: GOS + 2-FL 0,2 g/L	<ul style="list-style-type: none"> Las concentraciones circulantes en plasma de citocinas inflamatorias IL-1α, IL-1β, IL-6 y TNF-α e IL-1ra antiinflamatoria fueron significativamente más altas (82, 72, 76 y 58%, respectivamente) en el grupo FC que en el grupo LM Los grupos FE1 y FE2 mostraron perfiles significativamente diferentes al grupo FC y similares al grupo LM. En citocinas inducidas por VRS <i>ex vivo</i>, TNF-α e IFN-γ fueron significativamente más altos en el grupo FC que en el grupo LM (31 y 54%, respectivamente) Los grupos FE1 y FE2 no difirieron del LM Sin diferencias significativas entre FC y LM en citocinas estimuladas por fitohemaglutinina El grupo FC tuvo porcentajes significativamente más bajos de linfocitos T circulantes que el LM 	<p>Posibles sesgos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Muestras pequeñas que limitan la interpretación de los resultados No se determinó el estado secretor de los lactantes. Hubiera sido de interés determinar si el estado secretor tenía algún efecto sobre la modulación inmune producida por la dieta 2'FL Los cambios se midieron en un único punto temporal. La determinación en más puntos podría permitir detectar cambios en la tasa de desarrollo inmune y el efecto de la duración de la exposición
Steenhout et al. (2016) ⁵² Berger et al. (2016) ⁵³	Bicéntrico (Italia, Bélgica) Aleatorizado Duración del estudio: 12 meses Efecto de una fórmula infantil con 2 oligosacáridos idénticos a los de la leche materna (2'FL y LNnT) en la microbiota intestinal	n= 175 lactantes con fórmula y 38 con LM (reclutamiento: 0-14 días) 3 grupos: • FC (87) • Fórmula con 2'FL (1 g/L) y LNnT (0,5 g/L) (n= 88) • Control: LM exclusiva (n= 38)	<ul style="list-style-type: none"> El consumo acumulado de antibióticos hasta los 12 meses se asoció a una comunidad específica de microbiota a los 3 meses, distinta de la observada en el grupo de LM La microbiota en los niños del grupo de estudio fue significativamente diferente de la del grupo control y más parecida a la del grupo de LM a los 3 meses de edad 	

(Continúa)

Estudios clínicos con HMO (Continuación)

Autor/es (año)	Diseño	Participantes	Respuesta	Comentarios
Puccio et al. (2017) ⁵⁴	Bicéntrico (Italia, Bélgica) Aleatorizado (misma muestra que el anterior) Duración del estudio: 12 meses • Ganancia de peso durante 4 meses • Antropometría a los 12 meses • Características de las heces • Microbiota fecal (16S ARNr) • Tolerancia • Morbilidad	n= 175 lactantes con fórmula y 38 con LM (reclutamiento: 0-14 días) 3 grupos: • Fórmula control (87) • Fórmula con 2'FL (1 g/L) y LNnT (0,5g/L) (n= 88) • Control: LM exclusiva (n= 38)	<ul style="list-style-type: none"> • Ganancia de peso durante 4 meses similar en los grupos 1 y 2 • Antropometría a los 12 meses (patrones de la OMS 2016): peso, longitud, IMC y perímetro cefálico sin diferencias entre los grupos 1 y 2 • Tolerancia sin diferencias entre los grupos 1 y 2 • Menos infecciones respiratorias del tracto inferior en el grupo 2 • Menos consumo de antibióticos y antipiréticos en el grupo 2 (figura 1) 	Posibles sesgos: La presencia de infecciones fue recogida en un diario por los padres; la administración de antibióticos y antipiréticos se realizó por el pediatra de cada lactante, lo que pudo ser muy variable según su criterio

FC: fórmula control; FE1: fórmula experimental 1; FE2: fórmula experimental 2; GOS: galactooligosacáridos; IFN: interferón; IMC: índice de masa corporal; 2'FL: 2'-fucosil-lactosa; LM: leche materna; LNnT: lacto-N-neotetraosa; 6'SL: 6'-sialil-lactosa; OMS: Organización Mundial de la Salud; TNF: factor de necrosis tumoral; VRS: virus respiratorio sincitial.

2 HMO idénticos a los presentes en la leche humana, 2'FL y LNnT, respecto a la ganancia de peso, el crecimiento, la tolerancia, la microbiota intestinal y el uso de medicación. El estudio incluyó a 175 lactantes sanos, entre 0 y 14 días de vida en el momento de la inclusión, y que recibieron de forma aleatorizada y ciega una fórmula para lactantes o la misma fórmula suplementada con la mezcla de LNnT y 2'FL (1 g/L de 2'FL y 0,5 g/L de LNnT) durante los primeros 6 meses. En este estudio inicial se observó que el crecimiento (peso, longitud y perímetro cefálico) era similar en ambos grupos de acuerdo con las curvas de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud para lactantes sanos durante los primeros 12 meses de vida. El estudio también demostró que la fórmula fue bien tolerada, con un ritmo y características de las deposiciones normales y similares a los observados en el grupo alimentado con leche materna⁵⁴. En este estudio también se observó que los niños que recibieron la fórmula suplementada con 2'FL y LNnT presentaron un menor número de infecciones respiratorias comunicadas por los padres, particularmente bronquitis, y una menor indicación de antibioterapia hasta los 12 meses de edad. El hecho de que la reducida morbilidad y medicación se prolongue hasta esta edad, cuando ya no recibían una fórmula con HMO, sugiere que 2'FL y LNnT pueden proporcionar beneficios inmunitarios.

A la vista de estos datos, es necesario desarrollar nuevos ensayos clínicos que profundicen en estos efectos clínicos a corto y medio plazo.

Legislación

La European Food Safety Authority evaluó la seguridad de 2'FL y LNnT, considerados nuevos ingredientes alimentarios, y demostró su seguridad para el consumo humano, tanto en lactantes como en niños pequeños. En junio de 2015 informó que

tanto 2'FL como LNnT podían administrarse a los lactantes (hasta el año de edad) de una forma segura cuando se añaden a una fórmula para lactantes o a una fórmula de continuación, en concentraciones máximas de 1,2 g/L de 2'FL y hasta 0,6 g/L de LNnT, en una relación 2:1 en la fórmula reconstituida; mientras que para niños pequeños (mayores de 1 año), las concentraciones seguras de ambos son las mismas, administrados de forma aislada o en combinación^{55,56}. En octubre de 2015 se completó la recomendación para niños (excluidos los lactantes), en la que se señalaba que pueden usarse como suplementos nutricionales con una dosis máxima de 0,6 g/día de LNnT y 1,2 g/día de 2'FL (solos o en combinación) para niños de corta edad (1-4 años) y un poco superiores para niños mayores (1,5 g/día de LNnT y 3 g de 2'FL)⁵⁷.

En marzo de 2016, la Comisión Europea autorizó la comercialización de LNnT⁵⁸ y 2'FL⁵⁹ como nuevos ingredientes alimentarios. Por su parte, la Food and Drug Administration publicó en mayo de 2016 (para 2'FL) y en agosto del mismo año para el LNnT, la resolución de considerar ambos ingredientes como «GRAS» (generalmente reconocidos como seguros), al añadirlos a las fórmulas infantiles en las cantidades señaladas anteriormente. Estas disposiciones abren paso a su comercialización en fórmulas infantiles, a la espera de demostrar en ensayos clínicos la eficacia de la intervención al compararlas con fórmulas no suplementadas.

En conclusión, en vista de los beneficios potenciales de los HMO, algunos de los cuales se constatan en los primeros estudios clínicos, es necesario realizar nuevos ensayos de intervención clínica en niños para confirmar dichos efectos sobre el sistema inmunitario, y su manifestación clínica en infecciones del tracto respiratorio y gastrointestinal. ■

Bibliografía

- Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr*. 2010; 156: 3S-7S.
- Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr*. 2010; 156: 26S-30S.
- Collado MC, Santaella M, Mira-Pascual L, Martínez-Arias E, Khodayar-Pardo P, Ros G, et al. Longitudinal study of cytokine expression, lipid profile and neuronal growth factors in human milk from term and preterm deliveries. *Nutrients*. 2015; 7(10): 8.577-8.591.
- Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet*. 1990; 336: 1.519-1.523.
- Patel AL, Johnson TJ, Engstrom JL, Fogg LF, Jegier BJ, Bigger HR, et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2013; 33: 514-519.
- Sullivan S, Schanler RJ, Kim JH, Patel AL, Trawöger R, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. An exclusive human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine-milk based products. *J Pediatr*. 2010; 156: 562-567.
- Martínez Costa C, Khodayar Pardo P. Lactancia materna. En: Sierra C, ed. *Errores en nutrición infantil*. Madrid: Ergon, 2014; 1-11.
- Pan American Health Organization (PAHO). *Lactancia materna y enfermedades no transmisibles*. Disponible en: www.paho.org/
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Plan de acción mundial para la prevención y control de las enfermedades no transmisibles 2013-2030*. Ginebra: OMS, 2013.
- Andreas NJ, Kammann B, Le-Doare KM. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. *Early Human Develop*. 2015; 91: 629-635.
- Hooper LV, Littman D, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012; 336: 1.268-1.273.
- Collado MC, Rautava S, Isolauri E, Salminen S. Gut microbiota: a source of novel tools to reduce the risk of human disease? *Pediatr Res*. 2015; 77(1-2): 182-188.
- Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, Capretti R, et al. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatr Res*. 2006; 59: 377-382.
- Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr*. 2012; 3: 383S-391S.
- Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Develop*. 2015; 91: 619-622.
- Lawrence RA, Lawrence RM. *Biochemistry of human milk*. En: Lawrence RA, Lawrence RM, eds. *Breastfeeding. A guide for medical profession*, 7.^a ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2011; 98-152.
- Kunz C, Meyer C, Collado MC, Geiger L, García-Mantrana I, Bertua-Ríos B, et al. Influence of gestational age, secretor and Lewis blood group status on the oligosaccharide content of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017; 64(5): 789-798.
- Venema K. Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. *Int Dairy J*. 2012; 22: 123-140.
- Tao N, DePeters EJ, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. Variations in bovine milk oligosaccharides during early and middle lactation stages analyzed by high-performance liquid chromatography-chip/mass spectrometry. *J Dairy Sci*. 2009; 92: 2.991-3.001.
- Urashima T, Taufik E, Fukuda K, Asakuma S. Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals. *Biosci Biotechnol Biochemistry*. 2013; 77(3): 455-466.
- Zivhovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Human milk glyco-biome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108 Supl 1: 4.653-4.658.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero MM, et al. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology*. 2004; 14: 253-263.
- Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinzen-Derr JK, et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr*. 2004; 145: 297-303.
- Barile D, Rastall RA. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Curr Opin Biotechnol*. 2013; 24: 214-249.
- Bode L. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J Nutr*. 2006; 136(8): 2.127-2.130.
- Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012; 22: 1.147-1.162.
- Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annu Rev Nutr*. 2014; 34: 143-169.
- Kobata A. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010; 86(7): 731-747.
- Stahl B, Thurl S, Henker J, Siegel M, Finke B, Sawatzki G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Adv Exp Med Biol*. 2001; 501: 299-306.
- Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, Popovic M, Parker E, Lemay DG, et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome*. 2015; 3: 13.
- Newburg DS, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res*. 2007; 61(1): 2-8.
- Sela DA. Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides. *Int J Food Microbiol*. 2011; 149: 58-64.
- Hoeflinger JL, Chow J, Miller MJ. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. *J Agric Food Chem*. 2015; 63(12): 3.295-3.302.
- Jantscher-Krenn E, Bode L. Human milk oligosaccharides and their potential benefits for the breast-fed neonate. *Minerva Pediatr*. 2012; 64(1): 83-99.
- Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr*. 2005; 135: 1.304-1.307.
- Pratico G, Capuani G, Tomassini A, Baldassarre ME, Delfini M, Miccheli A. Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. *Nat Prod Res*. 2014; 28(2): 95-101.
- Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, Schmitt J, Boehm G, Dehlink E, et al. Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010; 21(8): 1.179-1.188.
- Eiwegger T, Stahl B, Schmitt J, Boehm G, Gerstmayr M, Pichler J, et al. Human milk derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatr Res*. 2004; 56: 536-540.
- Musilova S, Rada V, Vlkova E, Busenova V. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Beneficial Microbes*. 2014; 5(3): 273-283.
- Kuntz S, Rudloff S, Kunz C. Oligosaccharides from human milk influence growth related characteristics of intestinally transformed and nontransformed intestinal cells. *Br J Nutr*. 2008; 99: 462-471.

41. Chai W, Piskarev VE, Zhang Y, Lawson AM, Kogelberg H. Structural determination of novel lacto-N-decaose and its monofucosylated analogue from human milk by electrospray tandem mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 434(1): 116-127.
42. Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Müller-Werner B, Jelinek J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr*. 2010; 104 (9): 1.261-1.271.
43. Ruiz-Moyano S, Tottenb SM, Garrido DA, Smilowitzc JT, German JB, Lebrilla CB, et al. Variation in consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated strains of *Bifidobacterium breve*. *Applied Environ Microbiol*. 2013; 79: 6.040-6.049.
44. Barrow P. Toxicology testing for products intended for pediatric population. En: Sietseman WK, Schwen R, eds. *Nonclinical drug safety assessment: practical considerations for successful registration*. Washington, DC: FDA News, 2007; 411-440.
45. Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J Nutr*. 2000; 130(12): 3.014-3.020.
46. Coulet M, Phothirath P, Allais L, Schilter B. Pre-clinical safety evaluation of the synthetic human milk, nature-identical, oligosaccharide 2'-O-fucosyllactose (2'FL). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014; 68(1): 59-69.
47. Coulet M, Phothirath P, Constable A, Marsden E, Schilter B. Pre-clinical safety assessment of the synthetic human milk, nature-identical, oligosaccharide Lacto-N-neotetraose (LNnT). *Food Chem Toxicol*. 2013; 62: 528-537.
48. Prieto PA. In vitro and clinical experiences with a human milk oligosaccharide, lacto-N-neotetraose, and fructooligosaccharides. *Food Ingredients J Jpn*. 2005; 2010: 1.018-1.030.
49. Sprenger N, Lee LY, De Castro CA, Stenhout P, Thakkar SK. Longitudinal evolution of selected human milk oligosaccharides and association to infants' growth. *Society for Research in Human Milk & Lactation Conference, Stellenbosch, South Africa, 3-7th March 2016* [abstract].
50. Marriage BJ, Buck RH, Goehring KC, Oliver JS, Willimas JA. Infants fed a lower calorie formula with 2'FL show growth and 2'FL uptake like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 61: 649-658.
51. Goehring KC, Marriage BJ, Oliver JS, Wilder JA, Barrett EG, Buck RH. Similar to those who are breastfed, infants fed a formula containing 2'-fucosyllactose have lower inflammatory cytokines in a randomized controlled trial. *J Nutr*. 2016; 146: 2.559-2.566.
52. Steenhout P, Sperisen P, Martin FP, Sprenger N, Wernimont S, Pecquet S, et al. Term infant formula supplemented with human milk oligosaccharides (2'-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose) shifts stool microbiota and metabolic signatures closer to that of breastfed infants. *FASEB J*. 2016; 30 Supl 1: 275-277.
53. Berger B, Grathwohl D, Alliet P, Puccio G, Steenhout P, Sprenger N. Stool microbiota in term infants fed formula supplemented with human milk oligosaccharides and reduced likelihood of antibiotic use. *J Pediatr Gastroenterol. Nutr*. 2016; 63: 407S.
54. Puccio G, Alliet Ph, Cajozzo C. Effect of infant formula with human oligosaccharides on growth and morbidity: a randomized multicenter trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017; 64: 624-631.
55. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Safety of 2'-O-fucosyllactose as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) N.º 258/97. *EFSA J*. 2015; 13(7): 4.184.
56. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Safety of lacto-N-neotetraose as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) N.º 258/97. *EFSA J*. 2015; 13(7): 4.183.
57. EFSA Panel on Dietetic products, nutrition and allergies (NDA) Statement on the safety of lacto-N-neotetraose and 2'-O-fucosyllactose as novel foods ingredients in food supplement for children. *EFSA J*. 2015; 13(11): 4.299. 58. Decisión de Ejecución (UE) 2016/375 de la Comisión, de 11 de marzo de 2016, por la que se autoriza la comercialización de la lacto-N-neotetraosa como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n.º 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. DOUE L70/22, publicado el 16 de marzo de 2016.
59. Decisión de Ejecución (UE) 2016/376 de la Comisión, de 11 de marzo de 2016, por la que se autoriza la puesta en el mercado de 2'-O-fucosil lactosa como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n.º 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. DOUE L70/27, publicado el 16 de marzo de 2016.