

REVISIÓN

Proyecto internacional INSPIRE: «¿Qué es normal en la leche humana?» (I). Oligosacáridos de la leche humana

M.K. McGuire¹, C.L. Meehan², L. Ruiz^{3,4}, J. Mínguez⁵, K. Legarra⁶, M.A. Checa⁷, S. Manzano^{4,8}, L. Fernández⁴, J.M. Rodríguez⁴, L. Bode⁹; Consorcio INSPIRE*

¹School of Biological Sciences. ²Department of Anthropology. Washington State University. Pullman (Estados Unidos). ³Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Villaviciosa (Asturias). ⁴Departamento de Nutrición. Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. ⁵Hospital Materno-Infantil. Barbastro (Huesca). ⁶Ambulatorio de Durango. OSI Galdakao-Barrualde (Vizcaya). ⁷Centro de Atención Primaria Arrabal. Zaragoza. ⁸Probisearch. Tres Cantos. Madrid. ⁹Department of Pediatrics. University of California. San Diego (Estados Unidos)

Resumen

La leche humana es un fluido complejo, compuesto por una amplia variedad de sustancias, entre las que se incluyen nutrientes y otros componentes bioactivos. Los datos disponibles en la actualidad sugieren que, en condiciones fisiológicas, el número y la concentración de estas sustancias pueden variar en función de muchos factores (base genética, etnia, localización geográfica, dieta, tiempo posparto...). En este contexto, el objetivo del proyecto internacional INSPIRE era conocer la variabilidad natural en la composición de la leche humana entre mujeres sanas que difieren en cuanto a su localización geográfica, etnia, dieta y situación socioeconómica, que se reflejan en la existencia de grandes diferencias en los factores ambientales, microbiológicos y socioculturales relacionados con la crianza y el entorno del recién nacido. En este artículo se muestra el diseño general del estudio y los resultados obtenidos con los oligosacáridos de la leche humana (HMO), uno de los componentes mayoritarios en este fluido biológico, con funciones biológicas muy relevantes para la salud infantil. Los resultados muestran un claro efecto de la cohorte ($p < 0,05$) sobre las concentraciones de casi todos los HMO. Además, la edad materna, el tiempo posparto, el peso y el índice de masa corporal se correlacionaron con varios HMO. Por otra parte, se observaron diferencias en el perfil de HMO entre poblaciones étnicamente similares pero que viven en lugares diferentes, lo que sugiere que los factores medioambientales pueden desempeñar un papel en la regulación de la síntesis de los diferentes HMO.

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

Palabras clave

Lactancia, oligosacáridos, hidratos de carbono, leche humana

Abstract

Title: Project INSPIRE «What's normal in human milk?» (I). Human milk oligosaccharides

Human milk is a complex fluid composed of a wide variety of substances. The data currently available suggest that, under physiological conditions, the number and concentration of these substances can vary depending on many factors (genetic background, ethnicity, geographic location, diet, postpartum time...). In this context, the aim of the INSPIRE project was to know the natural variability in the composition of human milk among healthy women that differ in their geographical location, ethnicity, diet and socio-economic situation. This article shows the general design of the study and the results obtained regarding human milk oligosaccharides (HMOs), one of the major components in this biological fluid and whose biological functions are very relevant to infant health. The results show a clear effect of the cohort ($p < 0.05$) on the concentrations of almost all HMOs. In addition, maternal age, postpartum time, weight and body mass index were correlated with several HMOs. On the other hand, differences were observed in the profile of HMOs between populations that are ethnically similar but live in different places, which suggests that the environment may play a role in the regulation of the biosynthesis of certain HMOs.

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

Keywords

Lactation, oligosaccharides, carbohydrates, human milk

*Los integrantes del Consorcio INSPIRE se detallan en el anexo al final del artículo.

Fecha de recepción: 04/02/19. Fecha de aceptación: 06/02/19.

Correspondencia: J.M. Rodríguez. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Correo electrónico: jmrodrig@ucm.es

Introducción

La leche humana está específicamente diseñada para cubrir las necesidades nutricionales del lactante durante sus primeros meses de vida. Además, contiene una gran cantidad de factores bioactivos, entre los que se incluyen factores inmunitarios celulares y solubles¹, oligosacáridos² y bacterias^{3,4}, que desempeñan papeles clave en el desarrollo de la homeostasis intestinal y sistémica. Todo ello hace que la leche humana confiera un elevado grado de protección frente a una amplia gama de enfermedades infantiles, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo⁵⁻⁷.

Los datos disponibles sugieren que, en condiciones fisiológicas, existe una notable variabilidad interindividual en el número y concentración de las sustancias biológicamente activas presentes en la leche. Este hecho puede depender de muchos factores (base genética, etnia, localización geográfica, dieta, exposiciones antigénicas, edad gestacional, tiempo posparto...). Por tanto, es razonable suponer que no existe un único estándar por el que la leche humana se pueda considerar «normal», sino un amplio abanico de composiciones que permiten un crecimiento y un desarrollo infantil normales que, en gran medida, dependen de las circunstancias de la vida de un individuo.

En este contexto, el objetivo del proyecto internacional INSPIRE era conocer la variabilidad natural en la composición de la leche humana entre mujeres sanas que diferían en cuanto a su localización geográfica, etnia, dieta y situación socioeconómica. En este artículo se muestra el diseño general del estudio y los resultados obtenidos en relación con el estudio del perfil de oligosacáridos de la leche humana (HMO).

Los oligosacáridos de la leche humana son glucanos complejos muy abundantes en esta². La leche humana madura contiene entre 5 y 20 g de HMO/L, concentraciones que a menudo exceden las de proteína y que son aún mayores en el calostro. En contraste, la leche bovina contiene cantidades notablemente menores de oligosacáridos y sus estructuras difieren mucho de las existentes en la leche humana⁸. Los HMO ejercen numerosas funciones: a) actúan como prebióticos, fomentando el crecimiento de bacterias particularmente beneficiosas en el tracto gastrointestinal del lactante^{9,10}; b) actúan como sustancias antiadhesivas, reduciendo la unión de numerosos patógenos a la mucosa intestinal¹¹⁻¹³; c) actúan como antimicrobianos, evitando la proliferación de patógenos¹⁴; d) modulan las respuestas de las células inmunitarias y epiteliales de la mucosa intestinal^{15,16}, y e) están implicadas en el desarrollo del sistema nervioso central infantil¹⁷. Las funciones específicas de los HMO dependen fundamentalmente de su estructura¹⁸ y, por tanto, un mejor conocimiento del perfil y la cantidad de los HMO ingeridos por los lactantes puede proporcionar información relevante que permita la optimización de la salud durante esta fase crítica de la vida. Aunque hay variaciones sustanciales en las concentraciones y perfiles de HMO presentes en la leche humana¹⁹, se sabe muy poco sobre los factores responsables de tal variabilidad²⁰.

Diseño del estudio

El reclutamiento de las mujeres que participaron en este estudio observacional transversal se realizó entre mayo de 2014 y abril de 2016. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: a) mujeres lactantes mayores de 18 años; b) mujeres entre 2 semanas y 5 meses posparto; c) mujeres que amamantaban o se extraían leche al menos 5 veces al día, y d) madres y niños sanos y bien nutridos. Los criterios de exclusión incluyeron: a) mastitis o dolor mamario; b) tratamiento de la madre y/o el hijo con antibióticos en los últimos 30 días, y c) niños con signos y/o síntomas de enfermedad.

Las mujeres pertenecían a 11 cohortes (España, Suecia, Perú, Estados Unidos-Washington, Estados Unidos-California, Etiopía-rural, Etiopía-urbana, Gambia-rural, Gambia-urbana, Ghana y Kenia) de 8 países distintos. Las mujeres españolas (ES; n= 41) se reclutaron en Madrid, Zaragoza, Huesca y Vizcaya; las suecas (SW; n= 24; todas nórdicas), en Helsingborg; las peruanas (PE; n= 43), en un área periurbana de Lima; las estadounidenses-Washington, en el sudeste de Washington y el noroeste de Idaho (USW; n= 41); las estadounidenses-California, en el sur de California (USC; n= 19; todas hispanas); las etíopes rurales en las tierras altas de la Región de los Pueblos, Nacionalidades y las Naciones del Sur (ETR; n= 40); las etíopes urbanas (ETU; n= 40; etnia Sidama), en Hawassa; las gambianas rurales (GBR; n= 40; etnia Mandinka) en la región de West Kiang; las gambianas urbanas (GBU; n= 40; etnia Mandinka), en Bakauarea; las ghanesas (GH; n= 40; etnias Krobo o Dangme), en el sudeste de Ghana, y las kenianas (KE; n= 42), en la ciudad multiétnica de Nakuru.

Se obtuvieron las autorizaciones de los comités de ética de todas las instituciones participantes, además de la aprobación general de la Junta de Revisión Institucional de la Washington State University (Referencia # 13264) y del Comité de Ética en Investigación Clínica Humana de la Unión Europea. Las hojas de consentimiento informado, junto con los criterios de inclusión y de exclusión, se redactaron en todos los lenguajes maternos de las distintas cohortes (cuando fue necesario). Se obtuvo el consentimiento informado de cada mujer participante. El estudio se registró en la base de datos de ensayos clínicos Clinical Trials (clinicaltrials.gov; referencia: NCT02670278).

Tras la obtención del consentimiento informado (verbal o escrito según el nivel de alfabetización), cada mujer completó un cuestionario con datos antropométricos (peso, altura, índice de masa corporal [IMC]...), demográficos y ambientales (edad de la madre y el niño, lugar de residencia, número de hijos previos y sus edades, familiares con los que compartían la vivienda, tipo de vivienda, disponibilidad de agua potable y tratamiento de efluentes, presencia de animales en el hogar...), dietéticos y de salud general de la madre y el lactante (atención recibida durante el embarazo y parto, modo de parto, problemas de salud materna e infantil, medicación recibida...). También se tuvieron en cuenta los índices de desarrollo humano de cada país, según la clasificación actual de la ONU²¹:

bajo (ETU, GBR, GBU y KE), medio (GN), alto (PE) o muy alto (SP, SW, USC y USW).

Obtención y almacenamiento de las muestras

Antes de recoger la muestra, la madre o el personal del equipo de investigación presente en cada lugar de recogida (según la aceptabilidad cultural) limpió el pecho 2 veces con toallitas de jabón de un solo uso preempaquetadas (Professional Disposables International, Inc., Orangeburg, Estados Unidos). Se recogieron al menos 20 mL (normalmente 40-60 mL) en un recipiente de polipropileno estéril de un solo uso (Medela, Inc., McHenry, Estados Unidos). Para ayudar a controlar los sesgos que podrían darse en esta fase del estudio, en todos los lugares se emplearon los mismos materiales (guantes, toallitas, recipientes de recolección, etc.) y procedimientos (forma de limpieza y extracción) para la recolección de las muestras.

La leche se colocó inmediatamente en hielo o en una caja a ≤ 4 °C, distribuyéndose en alícuotas de 5 mL dentro de la primera hora tras su obtención. Inmediatamente, la leche se congeló ($-20/-80$ °C) y las alícuotas de cada cohorte se enviaron en hielo seco ($-78,5$ °C; World Courier) a los distintos laboratorios donde se realizaron las determinaciones analíticas. El análisis del perfil de HMO se realizó en la Universidad de California (San Diego, Estados Unidos), el análisis del perfil de sustancias inmunológicas en la Universidad Complutense de Madrid y el análisis metataxonómico (microbioma) en paralelo en la Universidad de Idaho (Moscow, Estados Unidos) y en la Universidad Complutense de Madrid. Con el fin de eliminar o minimizar posibles sesgos entre laboratorios, una vez recibidas las muestras en los laboratorios de análisis, todas se sometieron a un único ciclo de congelación-descongelación, y las alícuotas recibidas en los distintos laboratorios fueron procesadas por los mismos investigadores utilizando los mismos equipos y los mismos lotes de reactivos.

Análisis de los oligosacáridos de la leche humana

El perfil de HMO presente en cada muestra se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando una técnica descrita previamente²². Brevemente, la leche humana (20 μ L) se enriqueció con rafinosa (un hidrato de carbono no HMO) como patrón interno para permitir la cuantificación absoluta. Los oligosacáridos se extrajeron mediante un procedimiento de extracción en fase sólida de alto rendimiento con microcolumnas C18 (Thermo Scientific HyperSep) y se marcaron fluorescentemente con 2-aminobenzamida. Los oligosacáridos marcados se analizaron con el uso de HPLC en una columna de amida-80 con un sistema tampón de formiato de amonio-acetonitrilo a una concentración de 50 mmol/L. La se-

paración se realizó a 25 °C y se controló con el uso de un detector de fluorescencia a una excitación de 360 nm y una emisión de 425 nm. La anotación de los picos se basó en los tiempos de retención del estándar y en un análisis de espectrometría de masas con el uso de un espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones (Thermo LCQ) que estaba equipado con una fuente de ionización de nanoelectropulverización. Las concentraciones absolutas se calcularon sobre la base de las curvas de respuesta estándar para cada uno de los HMO anotados.

En total, se identificaron y cuantificaron los siguientes 19 HMO: 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, 3'-sialil-lactosa, 6'-sialil-lactosa, difucosil-lactosa, difucosil-lacto-N-hexosa, difucosil-lacto-N-tetrosa (DFLNT), disialil-lacto-N-hexosa (DSLNH), disialil-lacto-N-tetraosa (DSLNT), fucodisialil-lacto-N-hexosa (FDSLNH), fucosil-lacto-N-hexosa (FLNH), lacto-N-fucopentosa (LNFP I, LNFP II, LNFP III, lacto-N-hexaosa, lacto-N-neotetraosa (LNnT), lacto-N-tetrosa (LNT), sialil-lacto-N-tetraosa b (LSTb) y sialil-lacto-N-tetraosa c (LSTc). Las concentraciones de los HMO se expresaron en nm/mL. Para las comparaciones, se tuvieron en cuenta tanto las concentraciones individuales de cada HMO como la concentración total de HMO (suma de las concentraciones de todos los oligosacáridos anotados en cada muestra). Los HMO también se agruparon de acuerdo con los elementos estructurales comunes (unión de ácido siálico al HMO, tipo de cadena, tipo de enlace). Finalmente, las mujeres se dividieron en «secretoras» o «no secretoras» en función de la presencia o no, respectivamente, de 2'-fucosil-lactosa en las muestras de leche. La 2'-fucosil-lactosa sólo se sintetiza si la mujer tiene una copia activa del gen secretor (FUT2) y, por tanto, expresa la enzima α 1-2-fucosil-transferasa, responsable de su biosíntesis.

Todos los análisis estadísticos exploratorios y descriptivos se realizaron con el uso del software R (versión 3.3.2; R Foundation for Statistical Computing), de la forma descrita por McGuire et al.²³. Dentro del análisis estadístico, se examinaron las posibles agrupaciones de los perfiles de HMO por cohorte, continente y etnia, IMC, tiempo posparto, paridad y edad materna. En esta evaluación, las variables continuas se categorizaron de la siguiente manera: IMC ($<18,5$, $18,5-24,9$ y ≥ 25), tiempo posparto (cuartiles: 20-46, 47-63, 64-78 y 79-161 días), paridad (1, 2 y ≥ 3 hijos) y edad materna (cuartiles: 18-22, 23-27, 28-32 y 33-46 años).

Resultados

Efectos de la cohorte sobre las concentraciones individuales de HMO y las agrupaciones de HMO

Los valores medios para las concentraciones de HMO individuales y totales para cada cohorte se detallan en la tabla 1. Se observó un efecto de la cohorte sobre la concentración total de HMO y sobre las concentraciones de todos los tipos de HMO,

TABLA 1
Concentraciones (medias) de los HMO totales e individuales presentes en las muestras analizadas en este proyecto

	Etiopía		Gambia		Ghana	Kenia	Perú	España	Suecia	Estados Unidos	
HMO (nmol/mL)	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	(n= 40)	(n= 42)	(n= 43)	(n= 41)	(n= 24)	Washington (n= 41)	California (n= 19)
2'FL	2.264	2.853	2.950	4.220	1.438	3.380	6.528	3.906	5.661	4.159	7.043
3FL	189 ^{a,b,c}	184 ^{b,c}	103 ^c	162 ^{b,c}	192 ^{b,c}	195 ^{b,c}	209 ^{a-c}	206 ^{a-c}	473 ^a	122 ^{b,c}	388 ^{a,b}
LNnT	838 ^{a-c}	927 ^{a-c}	1.423 ^a	781 ^{b,c}	866 ^{a-c}	1.073 ^{a,b}	588 ^c	548 ^c	854 ^{a,b,c}	776 ^{b,c}	793 ^{a-c}
3'SL	413	526	465	505	618	528	528	607	467	562	473
DFLac	179	290	338	355	393	338	470	307	275	270	374
6'SL	374 ^{c,d}	545 ^{a,b}	462 ^{a-c}	585 ^{a,b}	890 ^a	435 ^{b,c}	636 ^{a,b}	504 ^{a-c}	200 ^d	402 ^{b,c,d}	294 ^{c,d}
LNT	1.304 ^{b,c}	1.408 ^{a,b}	2.265 ^a	1.576 ^a	1.882 ^a	1.632 ^a	953 ^b	1.570 ^a	2.132 ^a	1.135 ^{a,b}	1.438 ^{a,b}
LNFP I	904	1.276	1.153	1.343	1.292	921	1.116	1.056	1395	850	1.368
LNFP II	1.618 ^b	1.713 ^{a,b}	1.925 ^{a,b}	1.551 ^{a,b}	1.133 ^{a,b}	1.667 ^b	1.115 ^{a,b}	2.001 ^{a,b}	1.893 ^{a,b}	2.125 ^{a,b}	1.240 ^a
LNFP III	44 ^{b,c}	24 ^c	40 ^{b,c}	30 ^{b,c}	47 ^{b,c}	46 ^{b,c}	53 ^{b,c}	32 ^{b,c}	269 ^a	25 ^c	76 ^{a,b}
LSTb	867 ^a	79 ^a	132 ^a	96 ^a	115 ^a	86 ^a	41 ^b	105 ^a	140 ^a	82 ^a	79 ^{a,b}
LSTc	101 ^c	169 ^{a,b}	159 ^{a,b}	146 ^{a-c}	246 ^a	158 ^{a-c}	182 ^{a,b}	72 ^c	92 ^{b,c}	112 ^{b,c}	103 ^{b,c}
DFLNT	758	1.057	913	1032	1.105	1082	1.076	1.406	1.388	1246	1.418
LNH	68	86	112	92	109	92	107	58	113	93	39
DSLNT	310 ^{c,d}	553 ^{a,b}	870 ^a	477 ^{b,c}	561 ^{a,b}	444 ^{b-d}	274 ^d	357 ^{b-d}	216 ^d	443 ^{b,c,d}	275 ^{b-d}
FLNH	5 ^c	27 ^b	30 ^{a,b}	35 ^{a,b}	32 ^b	33 ^b	50 ^{b,c}	83 ^a	10 ^{b,c}	73 ^a	7 ^{b,c}
DFLNH	84 ^c	94 ^c	87 ^c	123 ^{a-c}	81 ^{b,c}	64 ^c	195 ^{a,b}	115 ^{a-c}	285 ^a	98 ^{b,c}	93 ^{a-c}
FDSLNH	158 ^{a,b}	240 ^{a,b}	197 ^{a,b}	199 ^{a,b}	182 ^{a,b}	204 ^{a,b}	245 ^{a,b}	314 ^a	83 ^b	370 ^a	70 ^b
DSLNH	50 ^b	136 ^a	109 ^{a,b}	129 ^{a,b}	126 ^{a,b}	101 ^{a,b}	108 ^{a,b}	103 ^{a,b}	55 ^{a,b}	93 ^{a,b}	33 ^b
Total	9.748 ^c	12.187 ^{a,b,c}	13.732 ^{a,b}	13.435 ^{a,b}	11.307 ^{b,c}	12.480 ^{a-c}	14.474 ^{a,b}	13.349 ^{a,b}	15.998 ^a	13.035 ^{a,b}	15.606 ^{a,b}

Las desviaciones estándares para cada media se muestran en McGuire et al.²³. Los valores en una fila que no comparten un superíndice común son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). HMO: oligosacáridos de la leche humana.

a excepción del LNFP I. A modo de ejemplo, las concentraciones de DSLNT variaron desde un mínimo de 216 ± 14 nmol/mL en Suecia hasta un máximo de 870 ± 68 nmol/mL en Gambia rural ($p < 0,05$). La concentración de LNFP III fue significativamente mayor en la leche producida por las mujeres suecas que por las del resto de cohortes ($p < 0,05$), a excepción de las de USC, mientras que la concentración de LSTb resultó menor ($p < 0,05$) en la leche producida por las mujeres de Perú y de USC que en la del resto de cohortes. Además, las concentraciones de 2'-fucosil-lactosa fueron 4-5 veces más altas en las muestras que se recolectaron en la USC (7.043 ± 858 nmol/L) y Perú (6.528 ± 435 nmol/L) que en las muestras obtenidas en Ghana (1.428 ± 207 nmol/mL), aunque en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

También se observaron varias diferencias dentro de las muestras proporcionadas por las mujeres de Etiopía dependiendo de la cohorte (rural frente a urbana), a pesar de tratarse de cohortes genéticamente muy relacionadas. Así, las concentraciones de 6'-sialil-lactosa, LSTc y FLNH fueron mayores en la leche de ETU que en las de ETR. También se observaron diferencias relevantes entre las 2 cohortes (rural y

urbana) de Gambia. Por ejemplo, la concentración de LNnT en la leche de la cohorte rural de Gambia fue más alta que la producida por la urbana (1.423 ± 117 y 781 ± 61 nmol/mL, respectivamente; $p < 0,05$), y lo mismo sucedió con la DSLNT (870 ± 68 y 477 ± 45 nmol/mL, respectivamente; $p < 0,05$). También hubo varias diferencias entre las 2 poblaciones de Estados Unidos a pesar de que eran muy similares en términos de variables antropométricas y reproductivas. Por ejemplo, la concentración de FDSLNH fue mayor en el grupo USW que en el USC (370 ± 48 y 70 ± 9 nmol/mL, respectivamente; $p < 0,05$). Sin embargo, en este caso las 2 cohortes se diferenciaban en la etnia, ubicación geográfica, climatología y dieta, por lo que será necesario realizar nuevos trabajos para dilucidar los factores responsables de tales diferencias en el perfil de HMO.

Quando los HMO se agruparon en función de ciertos factores (unión de ácido siálico al HMO, tipo de cadena, tipo de enlace), también se observaron ciertas diferencias entre las cohortes (tabla 2). Por ejemplo, la leche producida por mujeres de Suecia y de USC fue la más fucosilada y la menos sialilada; además, la leche de ETR estaba menos sialilada que la de las

TABLA 2

Concentraciones (medias) de los distintos grupos de HMO presentes en las muestras analizadas en este proyecto.

HMO (nmol/mL)	Etiopía		Gambia		Ghana	Kenia	Perú	España	Suecia	Estados Unidos	
	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	(n= 40)	(n= 42)	(n= 43)	(n= 41)	(n= 24)	Washington (n= 41)	California (n= 19)
HMO con ácido siálico	2.010 ^{b,c}	3.179 ^a	3.570 ^a	2.941 ^a	3.605 ^a	2.704 ^{a,b}	2.640 ^{a,b}	2.835 ^a	1.606 ^c	2.968 ^a	1.705 ^{b,c}
HMO con fucosa ^b	7.226 ^b	9.198 ^{a,b}	9.074 ^{a,b}	10.558 ^{a,b}	7.474 ^b	9.415 ^{a,b}	12.797 ^a	11.254 ^{a,b}	13.679 ^a	10.953 ^{a,b}	13.963 ^a
HMO de bajo peso molecular ^a	3.240 ^b	4.108 ^{a,b}	3.980 ^b	5.471 ^{a,b}	3.138 ^b	4.538 ^{a,b}	7.900 ^a	5.223 ^{a,b}	6.800 ^{a,b}	5.245 ^{a,b}	8.199 ^{a,b}
Tipo 1 ^b	4.222 ^{b,c}	5.029 ^{a,b}	6.344 ^a	5.043 ^{a,c}	4.984 ^{a,c}	4.751 ^{a,c}	3.499 ^c	5.089 ^{a,c}	5.776 ^{a,b}	4.634 ^{a,c}	4.400 ^{a,c}
Tipo 2 ^c	983 ^{b,c}	1.120 ^{a,b}	1.622 ^a	957 ^{b,c}	1.159 ^{a,b}	1.277 ^{a,b}	824 ^{b,c}	652 ^c	1.215 ^{a,b}	913 ^{b,c}	972 ^{a,c}
α -1,2 ^d	3.169	4.129	4.103	5.562	2.731	4.302	7.644	4.962	7.056	5009	8.412
α -1,3 ^e	232 ^{b,c}	208 ^c	143 ^c	192 ^c	239 ^c	241 ^{b,c}	262 ^{b,c}	238 ^{b,c}	742 ^a	147 ^c	464 ^{a,b}
α -2,6 ^f	561 ^c	793 ^{a,b}	753 ^{a,c}	828 ^{a,b}	1.251 ^a	680 ^{b,c}	859 ^{a,b}	681 ^{b,c}	431 ^c	595 ^{b,c}	476 ^{b,c}

Las desviaciones estándares para cada media se muestran en McGuire et al.²³. Los valores en una fila que no comparten un superíndice común son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). HMO: oligosacáridos de la leche humana.

^aCalculado como 2'FL + 3'FL + 3'SL + 6'SL; ^bcalculado como LNT + LNFP I + LNFP II + LSTb + DSLNT; ^ccalculado como LNnT + LNFP III + LSTc; ^dcalculado como LNFP I + 2'FL; ^ecalculado como LNFP III + 3'FL; ^fcalculado como LSTb + LSTc + 6'SL.

TABLA 3

Porcentaje de mujeres de cada cohorte categorizadas como «secretoras»

Etiopía	Rural	65 ^c
	Urbana	78 ^{a,c}
Gambia	Rural	65 ^c
	Urbana	85 ^{a,c}
Ghana		68 ^{b,c}
Kenia		81 ^{a,c}
Perú		98 ^a
España		76 ^{a,c}
Suecia		79 ^{a,c}
Estados Unidos	Washington	68 ^{b,c}
	California	95 ^{a,c}

Los valores que no comparten un superíndice común son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

mujeres de ETU, y la leche producida por mujeres en el Perú estaba altamente enriquecida en HMO de pequeño tamaño molecular (grupo definido como la suma de las concentraciones de 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, 3'-sialil-lactosa y trisacáridos).

Efecto de la cohorte y del estado «secretor» en las concentraciones individuales de HMO

La proporción de mujeres que se clasificaron como secretoras también fue sustancialmente diferente en las distintas poblaciones (tabla 3), que varió desde el 65% en GBR y ETR y el 68% en USW y GN, hasta el 98% observado en la cohorte de Perú ($p < 0,01$). Sin embargo, el porcentaje de secretoras en la cohorte

de Perú (98%) fue similar al de la cohorte de USC (mujeres hispanas) (95%; $p = 1,00$). En el caso de las mujeres españolas, el porcentaje de secretoras fue similar al registrado en las cohortes de Suecia, ETU, KE y GBU.

Relaciones en las concentraciones individuales de HMO y diversas variables antropométricas, demográficas o reproductivas

En este proyecto se encontraron diversas asociaciones entre los perfiles de HMO y diversos parámetros, como la edad materna, el tiempo posparto, el IMC y el peso materno. La edad se correlacionó negativamente con las concentraciones de LNnT, LSTc y DSLNH ($r = -0,14$, $-0,17$ y $-0,15$, respectivamente) y positivamente con la de FLNH ($r = 0,15$). El peso materno y el IMC se correlacionaron positivamente con la 2'-fucosil-lactosa ($r = 0,20$ para ambos), la FLNH ($r = 0,19$ y $0,15$, respectivamente), la fucosa unida a HMO ($r = 0,21$ para ambos) y los HMO de bajo peso molecular ($r = 0,21$ y $0,23$, respectivamente). El peso materno también se correlacionó positivamente con la LNFP III ($r = 0,20$) y la DFLNT ($r = 0,14$). Por el contrario, el peso materno y el IMC se correlacionaron inversamente con las concentraciones de LNnT ($r = -0,16$ y $-0,21$, respectivamente) y de DSLNT ($r = -0,20$ y $-0,24$, respectivamente). El tiempo posparto se correlacionó inversamente con varios HMO: 6'-sialil-lactosa, LNFP III, LSTc, lacto-N-hexosa, DSLNT y oligosacáridos unidos en posiciones α 2,6 ($r = -0,31$, $-0,23$, $-0,40$, $-0,26$, $-0,13$ y $-0,36$, respectivamente).

Relaciones entre las concentraciones de HMO

También se detectaron correlaciones entre las concentraciones de diversos HMO. Por ejemplo, las concentraciones de 2'-fucosil-lactosa, difucosil-lactosa y LNFP I estaban correlacionadas ($r = 0,23$ - $0,54$); se trata de un resultado esperado,

ya que la síntesis de ambas en la glándula mamaria depende de la actividad de FUT2. De forma similar, las concentraciones de fucosa unida a HMO estaban correlacionadas con las de los HMO α 1-2-fucosilados ($r=0,82$), y las de 2'-fucosil-lactosa con las de los oligosacáridos de pequeño tamaño molecular ($r=0,98$). Igualmente, se observó una asociación positiva entre las concentraciones de LNT y LNnT ($r=0,75$), y negativa entre las de LNFP I y LNFP II ($r=-0,46$) y entre las de 2'-fucosil-lactosa y LNFP II ($r=-0,52$). Otras asociaciones positivas de interés fueron las de LNT y LNnT con DSLNT ($r=0,60$ y $0,62$, respectivamente), y la de LSTb con DSLNT ($r=0,55$).

Efecto de la cohorte en la diversidad de los HMO

Los valores de diversidad también difirieron entre las cohortes. En general, la diversidad y la homogeneidad de los HMO fueron más bajas en las muestras de Perú y Estados Unidos y más alta en las de Ghana. No hubo diferencias en la diversidad de los HMO entre las cohortes rurales y urbanas de ET o GB o entre las 2 cohortes de Estados Unidos.

Discusión

Los resultados de este estudio respaldan nuestra hipótesis de partida de que los tipos y concentraciones de los oligosacáridos de la leche producida por mujeres sanas varían entre las distintas poblaciones. Estas diferencias no parecen ser el resultado de una mera variación metodológica, ya que en este proyecto se recogieron, procesaron y analizaron todas las muestras de forma similar. En algunos casos, las diferencias se produjeron a pesar de unos antecedentes genéticos similares (p. ej., LNnTen GBR en comparación con GBU), lo que sugiere que ciertos factores ambientales pueden ser importantes. En otros casos, las diferencias se observaron en poblaciones con antecedentes antropométricos y reproductivos similares (p. ej., 2'-fucosil-lactosa en USC en comparación con USW), lo que sugiere que la genética, la epigenética u otros factores no documentados también pueden ejercer roles relevantes.

Es importante comprender los factores que determinan la variación de los HMO, ya que la estructura específica de cada una de estas sustancias puede tener efectos diferentes en la salud y en el riesgo de enfermedad de la población infantil. Así, la incidencia de diarrea en lactantes mexicanos fue mayor entre los que recibieron leche con bajas concentraciones de 2'-fucosil-lactosa (leche no secretora) que entre los que consumieron cantidades significativamente más altas de este HMO²⁴. Las concentraciones más altas de los HMO dependientes de FUT2, como la 2'-fucosil-lactosa, también se han asociado con un menor riesgo de alergia a los 2 y 5 años en niños con alto riesgo de alergia hereditaria²⁵ y con una menor tasa de alergias alimentarias en ratones²⁶. En este sentido, los resultados de nuestro trabajo han revelado variaciones significativas en el estado secretor y en las concentraciones de 2'-fucosil-lactosa entre las distintas cohortes.

Otras isoformas de HMO también tienen importantes implicaciones para la salud maternoinfantil. El consumo de cantidades elevadas de DSLNT, que es un HMO sialilado, parece ejercer un efecto protector frente a la enterocolitis necrotizante en roedores²⁷. Asimismo, se ha descrito que una menor concentración total de HMO y una mayor proporción de 3'-sialil-lactosa están relacionadas con un mayor riesgo de transmisión madre-hijo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)²², mientras que se ha sugerido que las diferencias en el perfil de HMO pueden estar relacionadas con una mayor o menor protección frente a la infección por el VIH en mujeres lactantes^{22,28} y con una mayor o menor mortalidad y morbilidad infantil en lactantes no infectados expuestos al VIH²⁹. La concentración total y el perfil de HMO en la leche humana también parecen tener relación con la ganancia de peso del lactante³⁰, y se ha descrito que la leche producida por madres de Malawi cuyos hijos estaban extremadamente delgados tenía concentraciones más bajas de HMO que la leche de las madres cuyos hijos tenían normopeso³¹. En conjunto, estos estudios sugieren que la variación en la composición de HMO puede afectar el fenotipo metabólico del lactante. Nuestros datos también revelaron correlaciones entre HMO individuales, lo que sugiere que algunas de ellas comparten vías biosintéticas comunes.

Uno de nuestros objetivos secundarios fue comparar y contrastar los contenidos y perfiles de HMO entre poblaciones étnicamente similares que vivían en diferentes lugares, encontrándose diferencias entre la leche producida por mujeres en GBU y GBR (ambos grupos de etnia Mandinka) y entre la leche producida por las mujeres en ETU y ETR (ambos grupos de etnia Sidama). Este hallazgo sugiere que las migraciones relativamente recientes (y que afectan a la dieta y al estilo de vida) pueden influir en la composición de HMO de la leche humana.

En conclusión, el proyecto ha proporcionado datos relevantes sobre lo que se puede considerar normal con respecto a la composición de HMO en la leche de mujeres sanas que viven en lugares y condiciones muy dispares. Serán necesarios más estudios para determinar cómo se relaciona la variación en la composición de los HMO con la salud maternoinfantil y para generar hipótesis sobre las relaciones estructura-función de los HMO que puedan probarse en estudios preclínicos y clínicos. Dichos estudios deberán reclutar mujeres de regiones (p. ej., Asia) que no se incluyeron en el estudio actual y, asimismo, evaluar posibles desviaciones de la composición cuando las mujeres o los niños no están sanos (diabetes mellitus, mastitis, infección por el VIH...). En cualquier caso, se trata del comienzo de un proyecto más amplio que permitirá comprender cómo los aspectos socioculturales, evolutivos, ambientales, genéticos y metagenómicos pueden influir en la composición de la leche humana y, en consecuencia, en la salud maternoinfantil. Es probable que la composición de la leche humana haya evolucionado diferencialmente, de forma que alimente de manera óptima a los niños que nacen en diversos contextos sociales, ambientales, genéticos y conductuales.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido posible gracias a la siguiente financiación: National Science Foundation (Estados Unidos, ref.: 1344288), Ministerio de Economía y Competitividad (España, proyecto AGL2016-75476-R). Comisión Europea (ref.: 624773; FP-7-PEOPLE-2013-IEF). Los kits para la recogida de las muestras (estériles, de un solo uso) fueron donados por Medela Inc. (Suiza). Los autores agradecen la contribución imprescindible de numerosos investigadores y clínicos en la solicitud de los permisos, el reclutamiento de las mujeres participantes y la recogida, conservación y envío de las muestras.

Integrantes del Consorcio INSPIRE:

El consorcio INSPIRE está formado por los siguientes investigadores: Mark A. McGuire, Janet E. Williams, Sarah L. Brooker, William J. Price, Bahman Shafii, James Foster (University of Idaho, Moscow, Estados Unidos), Daniel W. Sellen (University of Toronto, Canadá), Elizabeth W. Kamau-Mbuthia, Egidioh W. Kamundia, Samwel Mbugua (Egerton University, Nakuru, Kenia), Sophie E. Moore (Elsie Widdowson Laboratory, Cambridge, Reino Unido) Andrew M. Prentice (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido), Linda J. Kvist (Lund University, Lund, Suecia), Gloria E. Otoo (University of Ghana, Accra, Ghana), Caitlyn Placek, Kimberly A. Lackey (Washington State University, Pullman, Estados Unidos), Bianca Robertson (University of California, San Diego, Estados Unidos) y Rossina G. Pareja (Nutrition Research Institute, Lima, Perú).

Bibliografía

- Gregory KE, Walker WA. Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant. *Curr Pediatr Rep*. 2013; 1: 1-11.
- Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012; 22: 1.147-1.146.
- Rodríguez JM, Jiménez E, Merino V, Maldonado ML, Marín ML, Fernández L, et al. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr Esp*. 2008; 66: 77-82.
- Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013; 69: 1-10.
- American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2005; 115: 496-506.
- US Department of Health and Human Services. The surgeon general's call to action to support breastfeeding, 2011. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52682/>
- Renfrew MJ, Pokhre S, Quigley M, McCormick F, Fox-Rushby J, Dodds R, et al. Preventing disease and saving resources: the potential contribution of increasing breastfeeding rates in the UK: Londres: UNICEF, 2012.
- 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.
- Newburg DS. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30 Supl 2: 8-17.
- Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. infantis reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 18.964-18.969.
- Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem*. 2003; 278: 14.112-14.120.
- Jiang X, Huang P, Zhong W, Tan M, Farkas T, Morrow AL, et al. Human milk contains elements that block binding of noroviruses to human histo-blood group antigens in saliva. *J Infect Dis*. 2004; 190: 1.850-1.859.
- Jantscher-Krenn E, Lauwaet T, Bliss LA, Reed SL, Gillin FD, Bode L. Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity in vitro. *Br J Nutr*. 2012; 108: 1.839-1.846.
- Gonia S, Tuepker M, Heisel T, Autran C, Bode L, Gale CA. Human milk oligosaccharides inhibit *Candida albicans* invasion of human premature intestinal epithelial cells. *J Nutr*. 2015; 145: 1.992-1.998.
- Kunz C, Rudloff S. Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 606: 455-465.
- 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: 1.179-1.188.
- Vázquez E, Barranco A, Ramírez M, Gruart A, Delgado-García JM, Martínez-Lara E, et al. Effects of a human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, on hippocampal long-term potentiation and learning capabilities in rodents. *J Nutr Biochem*. 2015; 26: 455-465.
- Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr*. 2012; 3: 383S-391S.
- Kobata A. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010; 86: 731-747.
- Erney RM, Malone WT, Skelding MB, Marcon AA, KlemanLeyer KM, O'Ryan ML, et al. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30: 181-192.
- United Nations Development Program. Work for Human Development. Human Development Report. Nueva York, 2015.
- Bode L, Kuhn L, Kim HY, Hsiao L, Nissan C, Sinkala M, et al. Human milk oligosaccharide concentration and risk of postnatal transmission of HIV through breastfeeding. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96: 831-839.
- McGuire MK, Meehan CL, McGuire MA, Williams JE, Foster J, Sellen DW, et al. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *Am J Clin Nutr*. 2017; 105: 1.086-1.100.
- Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinen-Derr JK, et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr*. 2004; 145: 297-303.

25. Sprenger N, Odenwald H, Kukkonen AK, Kuitunen M, Savilahti E, Kunz C. FUT2-dependent breast milk oligosaccharides and allergy at 2 and 5 years of age in infants with high hereditary allergy risk. *Eur J Nutr.* 2017; 56: 1.293-1.301.
26. Castillo-Courtade L, Han S, Lee S, Mian FM, Buck R, Forsythe P. Attenuation of food allergy symptoms following treatment with human milk oligosaccharides in a mouse model. *Allergy.* 2015; 70: 1.091-1.102.
27. Jantscher-Krenn E, Zharebtsov M, Nissan C, Goth K, Guner YS, Naidu N, et al. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut.* 2012; 61: 1.417-1.425.
28. Van Niekerk E, Autran CA, Nel DG, Kirsten GF, Blaauw R, Bode L. Human milk oligosaccharides differ between HIV-infected and HIV uninfected mothers and are related to necrotizing enterocolitis incidence in their preterm very-low-birth-weight. *J Nutr.* 2014; 144: 1.227-1.233.
29. Kuhn L, Kim HY, Hsiao L, Nissan C, Kankasa C, Mwiya M, et al. Oligosaccharide composition of breast milk influences survival of uninfected children born to HIV-infected mothers in Lusaka, Zambia. *J Nutr.* 2015; 145: 66-72.
30. Alderete TL, Autran C, Brekke BE, Knight R, Bode L, Goran MI, et al. Associations between human milk oligosaccharides and infant body composition in the first 6 mo of life. *Am J Clin Nutr.* 2015; 102: 1.381-1.388.
31. Charbonneau MR, O'Donnell D, Blanton LV, Totten SM, Davis JC, Barratt MJ, et al. Sialylated milk oligosaccharides promote microbiota-dependent growth in models of infant undernutrition. *Cell.* 2016; 164: 859-871.