Artículo de Revisión / Review Article

Leche Materna: Características funcionales de los oligosacáridos de la leche materna (Parte 2)

Breast Milk: Functional characteristics of breast milk oligosaccharides (Part 2)

RESUMEN

Oscar Brunser Tesarschü^{1,2*}.

Durante los primeros meses de vida, los oligosacáridos de la leche materna (HMOs) aportados por la leche materna participan en procesos asociados con la maduración de tejidos y sistemas del tubo digestivo, modulan algunos de sus procesos metabólicos y ejercen efectos prebióticos y antimicrobianos. Otros efectos estudiados son su contribución a la instalación, desarrollo y estimulación de la microbiota residente con predominio de *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, con efectos protectores frente a posibles colonizaciones o patologías por enteropatógenos (bacterianas, virus o parasitarias) que pueden actuar nivel local en el tubo digestivo, pero también pueden influir a nivel sistémico. Los HMOs modularían el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa, y probablemente previenen el desarrollo de fenómenos de atopia/alergia. Una patología propia de la etapa neonatal de los prematuros es la enterocolitis necrosante y algunos HMOs podrían disminuir el riesgo de su manifestación. Las actividades de los oligosacáridos de la leche materna contribuyen a la adaptación del lactante a los desafíos que plantea su entorno incluyendo la prevención de algunas patologías en edades posteriores, como es el caso de la diabetes tipo 1 y la obesidad.

Palabras clave: *Bifidobacterium*; *Bacteroides*; Enteropatógenos; Enterocolitis necrosante; Oligosacáridos de la leche materna.

ABSTRACT

During the first months of life, breast milk oligosaccharides (HMOs) stimulate development of the gastrointestinal tract in newborns and young infants; they modulate its metabolism and transport capabilities. Additionally, they exert prebiotic and antimicrobial activities and contribute to the development of the resident intestinal microbiota with a predominance of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* and protect from colonization and infections by enteropathogens (bacteria, virus or parasites). It is highly probable that their activities extend beyond infancy and persist into adult life. HMOs stimulate the development of the innate and adaptive immune systems and decrease the risk of atopy/allergy. Their intake has been associated with a degree of protec-

tion against as necrotizing enterocolitis among premature infants. HMOs contribute to the long term adaptation and protection of newborn infants to unfavorable conditions of their environment and in this way may contribute to protect breastfed infants from type 1 diabetes and obesity. **Keywords:** *Bifidobacterium*; *Bacteroides*; Enteropathogens; Human milk oligosaccharides; Necrotizing enterocolitis.

INTRODUCCIÓN

Los oligosacáridos de la leche materna y sus efectos sobre las funciones del tubo digestivo

Los estudios de la excreción fecal de oligosacáridos de la leche materna (HMOs) muestran que durante los dos primeros meses de vida éstos no son modificados

-
1. Profesor Titular de Pediatría, Universidad de Chile. Santiago, Chile.
 2. Representante en Chile, Nestle Nutrition Institute, Vevey, Suiza.

*Dirigir correspondencia a: Oscar Brunser Tesarschü.
Avda. Las Condes 11287, Las Condes, Santiago.
E-mail: : oscar.brunser@CL.nestle.com // obrunser@icloud.com.

Este trabajo fue recibido el 25 de febrero de 2019.
Aceptado con modificaciones: 23 de abril de 2019.
Aceptado para ser publicado: 06 de mayo de 2019.

por los procesos digestivos y aparecen intactos en las deposiciones^{1,2,3}; tampoco parecen servir de sustratos en vías metabólicas. Engler y Dotz^{2,4} sugieren que a los 2 meses de edad aparecen en las deposiciones moléculas resultantes de su hidrólisis en asociación con el desarrollo de enzimas del tubo digestivo y actividades enzimáticas de su microbiota.

En un estudio reciente^{4,5,6} fueron cuantificados los oligosacáridos fecales neutros en 23 muestras de 12 nacidos de término amamantados en forma exclusiva a los 2 meses de vida, así como muestras de lactantes alimentados con fórmulas y de un lactante alimentado con leche materna y fórmula; un subgrupo de estos participantes fue vuelto a evaluar a los 7 meses. A los 2 meses en las heces de la mayoría de los lactantes amamantados fueron detectados unos 50 HMOs diferentes y sus derivados, aunque no todos los HMOs estaban presentes en cada uno de los lactantes. En base a los perfiles de oligosacáridos fecales no sialilados, a los 2 meses de edad los lactantes fueron clasificados en 3 grupos: 1) un grupo con hasta 30 HMOs fecales diferentes; 2) un grupo en quienes predominaban sólo uno o unos pocos HMOs y en bajas cantidades y, 3) un grupo sin HMOs fecales. A los 7 meses no se detectaron HMOs ni derivados en las heces de ningún lactante. Esto sugiere que habría una relación entre la edad de los lactantes, sus HMOs fecales, y el desarrollo de su microbiota intestinal. Cuando los lactantes ya no son amamantados y reciben alimentación complementaria la microbiota desarrollaría la capacidad de degradar estos compuestos.

Otro estudio evaluó el efecto de 2'FL de una fórmula láctea sobre sus concentraciones sanguíneas; las fórmulas experimentales contenían 0,2 g/L de 2'FL y 2,2 g/L de GOS (fórmula experimental 1 FE1), o 1,0 g/L de 2'FL y 1,4 g/L de GOS (fórmula experimental FE2); el control fueron lactantes amamantados o alimentados exclusivamente con fórmula⁷. Al día 42 la concentración sanguínea de 2'FL fue más elevada en los lactantes del grupo FE2 que en el grupo FE1, cuyo nivel, a su vez, fue más alto que en aquellos alimentados con la fórmula control. Al cuantificar la fracción de 2'FL excretada en la orina, el porcentaje de 2'FL absorbido fue semejante en los dos grupos FE y en el grupo amamantado (lactantes amamantados 0,05%; FE1 0,07% y FE2 0,05%); en cantidades absolutas 2'FL en la orina estaba más elevada en FE2 que en FE1 que a su vez tenía excreciones urinarias más altas que el grupo control. La excreción urinaria de 2'FL (expresada como %) fue comparable en los tres grupos: 1,35% en los amamantados, 1,50% en FE1 y 1,26% en FE2. Al día 119 no se detectaron diferencias en los niveles plasmáticos de 2'FL entre los grupos FE ni existían diferencias en su absorción (los lactantes amamantados ya habían sido destetados); la proporción de 2'FL excretada en la orina fue comparable en FE1 y FE2: 1,44% y 1,12 %, respectivamente⁷. Estos resultados indican que en el tubo digestivo existiría una capacidad fija de transportar 2'FL independiente de su concentración en el lumen, lo que sugiere la existencia de un transportador para este compuesto.

Los HMOs y la adquisición de la microbiota residente del tubo digestivo

El nacimiento ocurre en el entorno complejo de una sala de parto, en que existen bacterias, virus y hongos comensales o patógenos que pueden representar amenazas para la salud del recién nacido. La colonización del tubo digestivo sigue secuencias y patrones que estimulan el desarrollo de mecanismos y factores defensivos, con efectos que pueden persistir por toda la vida.

De las bacterias detectadas inicialmente en el tubo digestivo del recién nacido algunas no son frecuentes en el ambiente y deben provenir de la madre. Después de su traspaso al recién nacido, estos microorganismos se desarrollan selectivamente, en procesos en que participarían los HMOs⁸.

La colonización temprana por una microbiota anormal está asociada con alteraciones de la inmunidad y con una mayor susceptibilidad a la atopia, obesidad, diabetes mellitus tipo 1 y enfermedades inflamatorias del tubo digestivo⁸. Los factores que alteran la evolución normal de la colonización, como el nacimiento por cesárea o el empleo de antibióticos en los primeros meses de vida, también serían importantes en la aparición de algunas patologías, incluso en adultos.

Al pasar el feto por el canal de parto, su tubo digestivo recibe microorganismos de este origen que también colonizan otras mucosas y la piel. El tubo digestivo del recién nacido es colonizado transitoriamente por lactobacilos de origen vaginal que no persisten porque son desplazados por otros microorganismos de origen fecal materno⁹. Esto significa que inmediatamente después del nacimiento los nacidos por vía vaginal adquieren una microbiota intestinal parecida a la población vaginal materna, con presencia de lactobacilos, *Prevotella* y *Sneathia*; quienes nacen por cesárea adquieren una microbiota más variada con semejanzas con la piel materna y la de los individuos de la sala de partos y su medio ambiente⁹.

¿Cuál es la relación entre las microbiotas intestinal materna y la del recién nacido? En el parto vaginal, la homología entre la microbiota del tubo digestivo materno y la del recién nacido es casi 70%; en los nacidos por cesárea esta es inferior al 50%¹⁰; estas diferencias pueden tener trascendencia en la génesis de patologías más tarde en la vida.

Los HMOs y la microbiota intestinal de los lactantes

Durante los primeros días de vida extrauterina los principales colonizadores del tubo digestivo de los recién nacidos son *Escherichia coli*, enterococos, estreptococos y clostridios; en los lactantes amamantados esta población es seguida rápidamente por poblaciones de anaerobios, especialmente *Bifidobacterium* y *Bacteroides*^{3,9,10,11,12}. Los recién nacidos alimentados con fórmulas, particularmente si han recibido antibióticos, son colonizados por perfiles diferentes, con mayor variedad de especies¹³. La leche materna, con su microbiota y péptidos bioactivos ejerce efectos selectivos sobre el desarrollo de la microbiota del

recién nacido¹⁴.

Algunas especies de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* son capaces de crecer y proliferar utilizando HMOs como único sustrato, lo que para ellas representa una ventaja adaptativa. Esto significa que estas bacterias poseen enzimas que les permiten metabolizar en el lumen intestinal carbohidratos complejos como la mucina y otras glicoproteínas presentes en el lumen intestinal; en estas especies es posible detectar una variedad de capacidades específicas para fermentar¹⁵: *Bifidobacterium longum subsp infantis* (*B. infantis*) coloniza el intestino de prematuros con más eficiencia que *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (*Bifidobacterium lactis*)^{16,17,18}.

Algunas bifidobacterias aisladas de deposiciones de lactantes de países africanos utilizan 2'FL y 3'FL y generan ácidos grasos de cadena corta, incluyendo ácido propiónico, que es antibacteriano para Gram negativos¹⁹. En un proceso de selección negativa, especies de Enterobacteriaceae, e incluso consorcios de bacterias aisladas de heces de cerdos lactantes, no crecieron con 2'FL, 6'SL o LNnT como sustratos, lo que significa que en los cerdos los HMOs dificultan la proliferación de algunas enterobacteriáceas²⁰.

Marcobal y cols.,^{15,21} estudiaron las capacidades metabólicas de *B. thetaiotaomicron* y *B. fragilis*, que son capaces de utilizar mucina y otros glucanos complejos como sustratos únicos y alcanzan recuentos elevados en el intestino de los recién nacidos. Ratones gnotobióticos fueron alimentados inicialmente con una dieta libre de polisacáridos y su intestino fue sembrado con 10⁸ UFC de ambas especies de *Bacteroides* y una cepa de *Bifidobacterium infantis* incapaz de crecer con LNnT o mucina como únicas fuentes de carbono. El grupo experimental, recibió 75 mg/día de LNnT al 1% p/v en agua durante 6 días y el control recibió sólo agua. Esta etapa fue seguida por 6 días en que ambos grupos sólo recibieron agua, fase que a su vez fue seguida por 3 días en que el grupo experimental volvió a recibir LNnT y el grupo control sólo agua. En los recuentos de bacterias fecales, *Bacteroides* crecía normalmente con LNnT como único sustrato, pero *B. infantis* sólo creció si estaba asociado con *Bacteroides*. Probablemente *Bacteroides* proporcionaba a *Bifidobacterium* sustratos de menor tamaño molecular y complejidad derivados de LNnT, que le permitían proliferar, creando un sistema de comensalismo que favoreció a *Bifidobacterium*. Seguramente en el lumen intestinal se establecen múltiples relaciones de este tipo involucrando diferentes especies y variedades de sustratos, lo que contribuye a explicar la complejidad de la microbiota y de su metabolismo, especialmente en la transición desde la lactancia a la alimentación complementaria^{15,21}.

Un estudio en lactantes norteamericanos de tres meses de edad comparó la microbiota fecal de un grupo amamantado en forma exclusiva (n=16) con la microbiota de lactantes alimentados con una fórmula (n= 6)²². Para correlacionar el perfil de los glucanos de la leche con la microbiota fecal de sus hijos, se obtuvo leche de las madres. En las muestras de leche fueron detectados 141 oligosacáridos en total, con un promedio individual de 63,4 ± 1,4 moléculas diferentes. Los

oligosacáridos fucosilados, sialilados y fucosilados-sialilados representaron 61,1 ± 2,5%, 11,0 ± 1,7% y 2,5 ± 0,4% del total, respectivamente; los oligosacáridos neutros no fucosilados representaron 25,3 ± 2,3% del total. Los HMOs más abundantes fueron LNT + LNnT, que sumaban 22,6%, seguidos por 2'FL con 14,5%, LNFP I con 9,48%, LNFP II con 8,17% y LDFT con 6,61%. Otros HMOs representaron menos de 5% del total. Las bacterias más abundantes en las heces de los lactantes fueron *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Veillonella* y *Rothia*; en algunos casos se podía predecir la presencia de especies de bacterias en las deposiciones conociendo los oligosacáridos presentes en la leche materna. A su vez, cada género de bacterias estaba asociado con múltiples HMOs y cada HMO estaba asociado con múltiples géneros de microorganismos²². Al fermentar HMOs algunos microorganismos sintetizaron ácidos grasos de cadena corta y lactato, que ejercen efectos metabólicos sistémicos. Estos ácidos hacen descender el pH del lumen del colon, modulan la composición de la microbiota, y ejercen actividades antibacterianas^{23,24}.

Este conocimiento podría ser utilizado para enriquecer y modular la composición de la microbiota fecal. Los hijos de madres portadoras del carácter secretor, cuya leche contiene altos niveles de oligosacáridos fucosilados, fueron colonizados por bifidobacterias más tempranamente y con mayor frecuencia que los hijos de madres no-secretoras, cuya leche no contiene 2'-FL. El carácter secretor depende de la actividad de la FUT2, que sintetiza 2'-FL; por lo tanto, la forma activa de este gen representa ventajas para los hijos de madres secretoras, quienes evidencian menor riesgo de diabetes tipo 1²⁸, enfermedad de Crohn²⁹ e incidencias más bajas de diarrea³⁰ así como tasas de supervivencia más altas en el caso de los prematuros³¹, en tanto que los hijos de madres no-secretoras son más resistentes a infecciones por rotavirus, norovirus y *H. pylori*²⁵⁻²⁷.

Otro estudio evaluó diadas madre/hijo con edades de 7 y 120 días de vida del lactante³². Al mes de edad fueron obtenidas muestras de leche de 41 madres cuyos hijos no habían desarrollado alergia a proteínas de la leche de vaca (APLV) y muestras de 39 madres cuyos hijos habían desarrollado APLV verificada mediante pruebas de confrontación oral. De 107 muestras de leche, 35 provinieron de 12 madres no-secretoras (33%) y 72 muestras de 32 madres secretoras (67 %). El estado secretor, cuantificado midiendo la concentración de 2'FL, no se correlacionó con la presencia de APLV (p= 0,38). En cambio, la duración de la lactancia en meses se correlacionó significativamente con los niveles de varios HMOs. La atopía materna se asoció marginalmente con la concentración de DSLT en la primera muestra de leche (p= 0,046) y con la detección de varios HMOs 2-fucosilados considerados indicadores de riesgo de atopía. Aparte de menores niveles de oligosacáridos fucosilados, la leche de las madres cuyos hijos sufrían de APLV tenían concentraciones más altas de compuestos sialilados y más bajas de oligosacáridos neutros no-fucosilados. Con todo, no se puede excluir que otros compuestos de la leche

materna modulen la susceptibilidad a la APLV³².

En otro estudio, los lactantes amamantados por madres portadoras del carácter secretor tenían en sus deposiciones poblaciones relativamente mayores de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* y niveles más bajos de enterobacterias, clostridios y estreptococos ($p < 0,05$). La mayor parte de las deposiciones de los lactantes amamantados por madres no-secretoras tenían recuentos más bajos de *Bifidobacterium* y más altos de *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia/Shigella* y *Streptococcus*³³.

En las deposiciones de niños amamantados, Davis y col.³⁴ identificaron HMOs cuya presencia se correlacionaba cuantitativamente con la microbiota del colon entre los 6 y los 120 días postparto. Los HMOs fecales podían estar intactos o parcialmente digeridos; adicionalmente fueron identificados glucanos simples e hidratos de carbono no derivados de oligosacáridos. En el análisis de los genes marcadores de las poblaciones de bacterias predominaron las bifidobacterias; una exogalactosidasa de *Bifidobacterium longum subsp. longum* era capaz de digerir HMOs hasta fragmentos moleculares pequeños, semejantes a aquellos presentes en las deposiciones; en cambio, este mismo enzima era incapaz de digerir hidratos de carbono que no tenían enlaces $\beta(1-4)$ -Gal. Usando como sustrato mucina u otros hidratos de carbono complejos, endoglucosidasas bacterianas dieron origen a glucanos de menor tamaño. Es posible que algunos microorganismos detectables en las deposiciones con recuentos bajos expliquen la presencia de algunos productos de fermentación. En general, las actividades enzimáticas detectadas en las deposiciones de los lactantes se correlacionaron con las especies de bacterias identificadas en los cultivos, lo que sugiere que habría correlaciones entre especies de microorganismos y productos de hidrólisis de oligosacáridos en las deposiciones. En cambio, otros oligosacáridos aumentan en las deposiciones, lo que indicaría que derivan de moléculas de mayor tamaño. Es posible que algunas especies de bacterias posean glucosidasas capaces de sintetizar sacáridos o de liberarlos por hidrólisis a partir de sustratos parecidos estructuralmente³⁴.

En *Bifidobacterium longum subsp. longum* SC596 fue identificado un conjunto de genes que posibilitan que esta bacteria utilice oligosacáridos fucosilados y al mismo tiempo facilita la utilización de HMOs neutros, lo que representaría ventajas adaptativas para los lactantes¹⁸.

Para estudiar si la abundancia de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* detectada en las deposiciones de niños de 4 meses de edad, hijos de madres portadoras del carácter secretor se mantenía en el tiempo, se evaluó qué ocurre en los hijos de madres no-secretoras. El estudio evaluó 17 madres de las que 11 (64,7%) eran portadoras del carácter secretor, quienes habían amamantado en forma exclusiva hasta los 4 meses de edad a 37 lactantes; 20 de sus hijos portaban el carácter secretor (71,4%). En las heces de los hijos de madres secretoras las bifidobacterias estaban aumentadas en comparación con los hijos de madres no-secretoras. En las heces de los niños portadores del carácter

no-secretor *Prevotella* estaba aumentada en comparación con los portadores del carácter secretor. A los 2-3 años de edad los hijos de las madres portadoras del carácter secretor tenían recuentos más elevados de bifidobacterias fecales, pero los recuentos de algunas especies de *Bacteroides* disminuyeron a los 4 meses y las diferencias iniciales con los hijos de madres no-secretoras perdieron significancia. El carácter secretor de las madres que amamantan en forma exclusiva por a lo menos 4 meses continúa modulando la composición de la microbiota intestinal de sus hijos a los 2-3 años³⁵.

En una investigación en 33 diadas madre/hijo de Gambia fueron evaluadas las posibles relaciones entre los HMOs de su leche materna con la microbiota intestinal de sus hijos; también fue evaluado su crecimiento, estado de salud, morbilidades y niveles de calprotectina fecal a las 4, 16 y 20 semanas postparto. En las heces de los lactantes las bacterias que predominaban pertenecían a los géneros *Bifidobacterium*, *Prevotella* y *B. infantis* y se correlacionaban negativamente con la presencia de SLNT-c. LNFP I se asoció con una menor prevalencia de morbilidades ($p < 0,02$); 3'SL resultó ser un buen marcador de la calidad de la relación peso/edad. La presencia de *Dialister* y *Prevotella* en las deposiciones se correlacionaba negativamente con la incidencia de morbilidades en general, en tanto que *Bacteroides* estaba aumentado cuando los niveles de calprotectina también lo estaban. El estado de la nutrición materna también se correlacionaba con la concentración de oligosacáridos en su leche: en la temporada en que los alimentos abundaban las madres producían significativamente más HMOs que aquellas que amamantaban en la temporada cuando la disponibilidad de alimentos era menor. Al correlacionar los niveles de HMOs con las morbilidades de los lactantes, cuando la leche materna tenía niveles más altos de LNT como porcentaje del total los hijos experimentaban más patologías ($p < 0,05$) mientras que con niveles relativamente más altos de LNFP I, los hijos sufrían menos morbilidades ($p = 0,02$). Existiría, por lo tanto, una correlación entre el estado nutricional materno, las concentraciones de HMOs en su leche y las morbilidades de sus hijos³⁶.

Otro estudio evaluó los cambios que podría inducir la administración de HMOs en la microbiota fecal de adultos sanos y sus posibles ventajas en relación con la ocurrencia de infecciones recurrentes por *Clostridium difficile*³⁷. Participaron 100 individuos de 19 a 57 años de edad quienes recibieron al día 5, 10 o 20 gramos de 2'FL, LNNT, o ambos en proporción 2:1 (g/g) por períodos de 14 días y 2 gramos de glucosa por día en el grupo control. Expresadas por kilogramo de peso estas cantidades de oligosacáridos están dentro de los rangos de lo que reciben los lactantes amamantados. En comparación con los valores basales, los recuentos de bifidobacterias (*philo Actinobacteria*) aumentaron significativamente al recibir 5 o 10 g/día de 2'-FL o 10 y 20 g/día de la mezcla de 2'FL y LNNT; los 20 g/día de 2'FL no tuvieron efecto. La proporción de especies del *philo Firmicutes*, principalmente lactobacilos, disminuyó al recibir

20 g/día de 2'FL mientras que los Gram negativos (*philo Proteobacteria*, disminuyeron significativamente con 10 g/día de 2'FL; no se detectaron efectos secundarios negativos. La administración de HMOs a adultos fortalece el desarrollo de bacterias beneficiosas (como las bifidobacterias), sin efectos indeseables y protegerían de la enterocolitis por *C. difficile*³⁷.

Los oligosacáridos de la leche materna como moduladores de interacciones entre los microorganismos y la mucosa del tubo digestivo

Para colonizar el tubo digestivo, una de las capacidades necesarias para los enteropatógenos es la de adherirse a los enterocitos, proceso que puede ser seguido por la invasión del epitelio y el eventual paso al torrente sanguíneo³⁸. Bacterias, virus y parásitos expresan lectinas, que los unen a glucanos complejos en el borde en cepillo de los enterocitos. Esta etapa precede a la proliferación del patógeno, su colonización del tubo digestivo y la manifestación de síntomas. Las lectinas son hidratos de carbono complejos cuya molécula tiene en su extremo unidades de F, M o ácido siálico, que confieren especificidad al enlace. Norovirus, se une a un epítipo específico del grupo Lewis/H que tiene como terminales α 1-2 fucosa o α 1-4 fucosa³⁹. Como los HMOs libres en el lumen intestinal poseen estructuras moleculares similares a los receptores de la membrana del ribete en cepillo, los HMOs funcionan como señuelos, que al unirse a las lectinas, bloquean la capacidad de los enteropatógenos de adherirse a los enterocitos; este mecanismo contribuye a prevenir episodios de diarrea.

Uno de los modelos más estudiados de la relación receptor-enteropatógenos-oligosacáridos es la diarrea causada por *Campylobacter jejuni*. Inicialmente se demostró que, a excepción de las inmunoglobulinas, ningún otro componente de la leche materna tenía la capacidad de bloquear *in vitro* la adherencia de *C. jejuni* a cultivos de células intestinales de cerdos recién nacidos; los oligosacáridos fucosilados de la leche resultaron ser altamente efectivos como bloqueadores de este proceso^{40,41}. Efectos semejantes fueron observados en muestras de mucosa intestinal humana *ex vivo* utilizando oligosacáridos fucosilados de la leche materna⁴¹. Los oligosacáridos neutros sólo protegieron parcialmente a ratones de la colonización por esta bacteria⁴². La 2'FL bloqueó *in vitro* la invasión del tubo digestivo por *Campylobacter* así como la liberación de péptidos indicadores de daño por enterocitos Hep-2 y HT-29 de origen humano, a semejanza de lo observado en los ratones. Otros efectos observados en los ratones incluían menores pérdidas de peso y lesiones histológicas menos intensas⁴³.

En un estudio en México fueron identificados los HMOs en muestras de leche de 93 madres y se confeccionó un registro de la alimentación que recibían sus lactantes, la frecuencia de episodios de diarrea y su sintomatología. El seguimiento iniciado al nacimiento duró 2 años; las muestras iniciales de leche fueron obtenidas entre la 1ª y la 5ª semanas después del parto. Los HMOS totales variaron

entre 1,0 y 36,1 mM/L y los 2'fucosilados entre 0,8 y 20,8 mM/L (50% a 92% del total). Los HMOs más abundantes fueron la 2'FL y LNFP-I, que representaron 34% y 25 % del total, respectivamente. En los lactantes amamantados fueron detectados 234 episodios de diarrea (promedio 2 por niño; rango 0-12 episodios) de los cuales 77 (33%) fueron moderados o graves. La incidencia de diarrea fue 28,8 casos por 100 niños/mes de amamantamiento y los casos moderados-graves fueron 9,5 casos/mes/100 niños/mes. Los episodios graves fueron menos frecuentes cuando la leche materna contenía niveles elevados de oligosacáridos 2'fucosilados como porcentaje del total ($p < 0,001$). Los episodios de diarrea asociados con *Campylobacter* ($n = 31$), fueron menos frecuentes cuando la leche materna contenía las concentraciones más altas de 2'FL ($p = 0,004$); existía una relación directa entre la incidencia de diarrea por *Campylobacter* y la concentración de LDFH-I como porcentaje de los HMOs totales ($p = 0,047$). En cambio, los episodios de diarrea asociados con calicivirus fueron menos frecuentes cuando la leche contenía niveles elevados de LNDFH-I, un compuesto fucosilado⁴³. El mismo grupo había estudiado anteriormente en la misma población 93 diadas madre/hijo evaluando la asociación entre el grupo sanguíneo Lewis, sus HMOs asociados y el riesgo de episodios de diarrea⁴¹. La leche de 67 madres Le^{a-b+} contenía más LNF-II (Le^x) que la leche de 24 madres Le^{a-b-} que contenía más LNF-I (H-I) y 2'FL (H-2). Los polimorfismos genéticos, expresados a través de los grupos Lewis generaron diferentes patrones de HMOs. Durante el seguimiento fueron detectados 4 episodios de diarrea asociados con *E. coli* productora de toxina termoestable (ETEC); la leche materna que ellos recibían tenía una relación baja entre los oligosacáridos con enlaces α 1-2 y aquellos con otros enlaces. Los 27 lactantes que desarrollaron episodios de diarrea de cualquier otra etiología tenían esta relación en niveles intermedios entre el grupo nombrado anteriormente y quienes permanecieron sanos. Los HMOS representarían un factor protector y serían parte de la inmunidad innata; sin embargo, al bloquear a algunos enteropatógenos la leche materna puede posibilitar la acción de otros microorganismos que se vuelven capaces de vulnerar la defensa representada por los HMOs⁴¹.

Clostridium difficile causa episodios de diarrea recidivante asociados con tratamientos con antibióticos o fármacos antitumorales; se caracteriza por una intensa inflamación de la mucosa del colon. *Clostridium difficile* produce dos toxinas, A y B; la toxina A posee en uno de sus extremos una estructura que le permite unirse a receptores los enterocitos e iniciar la colonización y la inflamación⁴⁵. Los 20 μ g/ml de HMOs en leche materna son capaces de neutralizar esta toxina; la eficiencia protectora es mayor si la concentración de los oligosacáridos aumenta⁴⁶. El conjunto de los ocho principales HMOs de la leche materna es más eficiente que la capacidad de la 2'FL o de los otros oligosacáridos por separado. La mayor capacidad de neutralizar la toxina estuvo asociada con la presencia de LNFP V y LNT, incluso en bajas concentraciones.

Para aclarar si la 2'FL previene episodios de diarrea porque inhibe la adherencia de patógenos al epitelio intestinal, su efecto fue estudiado en cerdos nacidos por cesárea e inoculados con *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) F18. Los animales recibieron un sustituto de leche para porcinos⁴⁷ con 10 g/L de 2'FL. Todos los animales desarrollaron diarrea, pero el período de incubación fue más breve y los episodios más intensos en los animales que no recibieron 2'FL. En presencia de 2'FL la pérdida de peso fue menor y el daño histológico de la mucosa intestinal distal fue menos intenso; en este grupo la actividad enzimática en el borde en cepillo fue más elevada en el intestino proximal. Los recuentos de ETEC F18 en el lumen intestinal fueron comparables en todos los grupos. Aunque 2'FL inhibe la adherencia de ETEC F18 a enterocitos de cerdos recién nacidos, sus efectos protectores fueron limitados⁴⁷.

El bloqueo de la adherencia de enteropatógenos a la mucosa intestinal también se produce en infecciones por virus. Algunos de estos agentes expresan en su cápside glucanos que les permiten unirse a las células intestinales del huésped. En los lactantes amamantados, la superficie del epitelio intestinal está cubierta por altas concentraciones de HMOs que pueden bloquear el acceso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a los enterocitos; por lo tanto, estos compuestos protegerían a los lactantes durante su exposición al virus presente en la leche de sus madres infectadas e inhibiría la transmisión vertical^{126,48}.

Como parte de un estudio en que la transmisión del VIH fue investigada en madres infectadas 4 meses después de la suspensión de la lactancia, 167 madres portadoras del virus fueron contactadas para investigar los mecanismos de transmisión, su eficiencia y el papel de la leche materna y sus factores defensivos, incluyendo los HMOs⁴⁸. Ochenta y una de ellas habían transmitido el virus a su hijo, 86 madres también infectadas no habían transmitido el virus y un grupo adicional de 36 madres no estaban infectadas (controles)^{1,36}. La mediana de las concentraciones de HMOs en la leche materna fue similar en los tres grupos, al igual que la distribución de sus HMOs. Los más abundantes fueron LNT, 2'FL, y LNFP II + III; en cambio, la concentración de 3'FL fue una de las más bajas. Las madres infectadas tenían concentraciones de 3'SL y LNNT más altas que las madres no infectadas ($p < 0,01$ y $p = 0,06$, respectivamente). La mediana de las concentraciones totales de HMOs menos la concentración de 3'SL, fue 1,48 g/L y 1,76 g/L, respectivamente, al comparar las madres transmisoras de infección con aquellas no transmisoras. El riesgo de transmitir el virus fue menor cuando la leche contenía más de 1,87 g/L de HMOs totales (RR 0,45; IC 95% 0,21; 0,97, $p = 0,04$). Las proporciones entre los HMOs variaban al comparar madres infectadas con no infectadas, dependiendo en gran parte de sus concentraciones totales: las proporciones más altas de 3'SL estaban asociadas con los recuentos más bajos de linfocitos CD4+ ($p = 0,01$) y con cargas virales ($p = 0,09$) y niveles de ARN viral plasmático más elevados ($p = 0,01$). En la población total del estudio que fue origen de

los datos recién comentados ($n = 958$), el seguimiento y análisis de la mortalidad de los lactantes de los tres grupos continuó hasta los dos años de edad^{36,49,50}. En la población expuesta pero no infectada, las concentraciones más altas de HMOs 2'-fucosilados (2'FL y LNFP I) (RR 0,33; IC 85% 0,14-0,74) y de compuestos fucosilados (3'FL y LNFP II + III) estaban asociadas con disminuciones de la mortalidad al ser amamantados (RR 0,28; IC 95% 0,13-0,67), diferencia que desapareció después del destete^{36,49}. En los niños infectados, aunque no se pudo establecer correlaciones entre la mortalidad y su perfil y concentración de HMOs, la lactancia ejerció efectos protectores. Una paradoja de la transmisión del VIH por las madres que amamantan es que, aunque tengan cargas virales considerables, sus hijos tienen bajas tasas de contagio a través de la leche. Para entender esta paradoja hay que considerar que, junto con los HMOs, la leche materna, incluye otros factores protectores que forman un sistema preventivo integrado bastante efectivo⁴⁸. Este estudio guarda algunos paralelos con el estudio de diarrea en México⁴⁴, donde los hijos de mujeres con las concentraciones más altas de 2'FL y LNFP tuvieron menor morbilidad asociada con *C. jejuni*, probablemente porque los oligosacáridos interfieren en la adherencia de la bacteria a los enterocitos. En la situaciones de saneamiento ambiental y nutrición probablemente deficientes prevalentes en Lusaka, las cifras elevadas de mortalidad en los hijos no infectados de madres portadoras de VIH observadas después del destete son explicadas probablemente por episodios de diarrea e infecciones respiratorias asociados con deterioros de su nutrición; por lo tanto, los HMOs protegerían mientras dura el amamantamiento⁵¹.

Oligosacáridos de la leche materna y diarrea viral

Norovirus es el agente viral asociado con mayor frecuencia con episodios de diarrea en niños. En la etapa inicial de la infección el virus interactúa con oligosacáridos del sistema Lewis secretor que fueron denominados antígenos de los histogrupos sanguíneos (HBGAs por su denominación en inglés, histo-blood group antigens)⁵². HMOs y HBGAs comparten similitudes en su estructura molecular y en la disposición espacial de sus monosacáridos y por lo tanto interactuarían con norovirus de manera parecida⁵⁵. Los HBGAs no sólo están presentes en secreciones del tubo digestivo, donde actúan como señuelos que bloquean los sitios que el virus usa para invadir el epitelio intestinal, sino que también son secretados en la saliva, las lágrimas y el semen⁵⁶.

Un estudio *in vitro* demostró que la 2'FL y la 3'FL son capaces de bloquear la adherencia de NV, RV y VIH a enterocitos^{54, 57}. Li y cols.^{58,59} estudiaron cerdos recién nacidos que recibieron ya sea una fórmula adaptada a sus requerimientos nutricionales (grupo control, F), la misma fórmula suplementada con 4 g/L de una mezcla de 2'FL, LNNT, 6'SL, 3'SL y ácido siálico libre, o con 0,4g/L de una mezcla de 90% GOS y 10% FOS⁵⁷. Cada grupo fue estudiado por períodos de 15 días; al décimo día, 7 u 8

animales de cada grupo recibieron una cepa de RV porcino. Durante el seguimiento fue evaluada la consistencia de las deposiciones y el día 15 fueron obtenidas muestras de sangre y el contenido del intestino delgado y del colon. En comparación con el grupo F los cerdos que recibieron HMOs o prebióticos tuvieron episodios de diarrea 50% más breves. Después de una fase inicial de diarrea, 57% de los animales del grupo F experimentaron una segunda fase de diarrea en comparación con 25% en los animales que habían recibido HMOs o prebióticos; los segundos episodios se prolongaron más allá del término del seguimiento. Los animales de ambos grupos experimentales desarrollaron anticuerpos específicos para la proteína NSP-4 del RV, lo que indica que éste fue capaz de proliferar en la mucosa intestinal. Además, en comparación con el grupo F experimentaron cambios en la expresión de interferón- γ y de la IL-6 (proinflamatoria) e IL-10 (antiinflamatoria) en el íleon. Los animales que recibieron los prebióticos tuvieron aumentos considerables de anticuerpos específicos anti-RV de las clases IgA, IgG y especialmente IgM, a semejanza de lo observado en niños con diarrea por este agente. En la mucosa del yeyuno e íleon de los cerdos había alteraciones histológicas con menor altura de las vellosidades y criptas más profundas⁵⁸. El colon contenía más materia seca, señal de alteraciones de los procesos de digestión y absorción. En especial en los animales que recibieron HMOs, hubo cambios de su microbiota, con aumentos de espiroquetas productoras de butirato. En resumen, aunque ni los HMOs ni los prebióticos previnieron los episodios de diarrea, acortaron su duración, fueron capaces de estimular respuestas inmunes y modificaron la microbiota, permitiendo mejorías más rápidas de la inflamación y menos alteraciones de la absorción de nutrientes⁵⁶. Estos resultados fueron confirmados en enteroides formados por células de mono verde africano infectados con RV humano; la protección ejercida por los HMOs disminuyó los efectos del RV sin afectar las capacidades defensivas de los enteroides, probablemente porque los HMOs bloquearon al RV antes de que entrara en contacto con el epitelio^{48,60}.

Un análisis de los HMOs identificables en la leche materna y su relación con los virus causantes de diarrea demostró que, además de los oligosacáridos presentes en mayores concentraciones en la leche materna, e independientemente de si las madres son portadoras o no del carácter secretor, existe un número de HMOs adicionales, estimados en al menos 32, capaces de unirse a las proteínas virales VP4 y VP8 y de bloquear, incluso en bajas concentraciones, la adherencia e invasión de los enterocitos⁶¹.

Un número reducido de estudios ha evaluado *in vitro* los HMOs como bloqueadores de *Entamoeba histolytica* y *Candida albicans*⁶². Para aclarar estos efectos en seres humanos será necesario realizar estudios clínicos.

Ocasionalmente los HMOs llegan a la vía aérea superior de los lactantes cuando aspiran leche materna; se ha tratado de determinar si estos compuestos ejercen

algún efecto protector. Un estudio reciente reveló que LNnT administrada a razón de 200 mg/L en una fórmula láctea no disminuyó la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*⁶³. Sin embargo, hay que considerar que el contacto con la vía aérea de la LNnT deglutida o aspirada accidentalmente es muy breve.

Es posible que algunos oligosacáridos ejerzan efectos protectores en el tracto urinario al ser excretados en la orina.

Los HMOs como moduladores de la inmunidad

El feto se desarrolla en un ambiente que permitirá contactos limitados con microorganismos o sus antígenos; al nacer el lactante, con sus sistemas inmunes innato y adaptativo en desarrollo, debe enfrentar a bacterias comensales y patógenas y antígenos de diverso origen²¹. El sistema inmune innato, la primera línea de defensa, está formado por la integridad de las mucosas, macrófagos libres, leucocitos y componentes humorales capaces de reaccionar defensivamente en forma rápida, aunque sin capacidad de memoria⁶⁴. En la inmunidad celular del feto y el recién nacido predominan los linfocitos T helper (Th) orientados a la expresión del fenotipo Th2, que produce reacciones de tipo humoral dirigidas a patógenos extracelulares, en contraste con el fenotipo Th1/Th17, que produce reacciones de inmunidad celular, es proinflamatorio y actúa preferentemente contra patógenos intracelulares⁶⁵. Es probable que la orientación del sistema inmune del feto hacia respuestas del tipo Th2 evite reacciones del feto contra su madre.

La mucosa del tubo digestivo es la superficie más extensa del organismo y entra tempranamente en contacto con microorganismos inocuos o patógenos; además debe producir respuestas adecuadas para facilitar y regular los procesos normales de colonización. También debe impedir que la función de barrera de la mucosa resulte alterada, así como la invasión del organismo por agentes patógenos. Los HMOs contribuirían a estimular y regular las respuestas de la mucosa del tubo digestivo, impidiendo tanto el eclipse de sus reacciones como aquellas exageradas que podrían ser destructivas. Esto significa que los HMOs deben tener la capacidad de modular el funcionamiento del sistema inmune y la síntesis de citoquinas, lectinas y TLRs que regulan los procesos inflamatorios⁴⁸. Como algunos HMOs traspasan la barrera intestinal y circulan en la sangre, también es probable que regulen efectos sobre la inmunidad sistémica.

En un estudio del riesgo de desarrollar alergia, Sprenger y cols⁶⁶ analizaron la leche de 266 madres cuyos hijos estaban en riesgo y cuantificaron los oligosacáridos dependientes de la FUT2 en la leche materna usando la 2'FL como índice de su actividad. Las mediciones fueron correlacionadas con la manifestación de alergia a los 2 años de edad y con los niveles de IgE circulante. La incidencia de eccema o de cualquier otra manifestación de alergia estuvo asociada con niveles de IgE más bajos en los nacidos por cesárea, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos ($p < 0,1$). En los nacidos por cesárea había asociaciones significativas al comparar los niveles de 2'FL

en la leche materna y “cualquier tipo de enfermedad alérgica y de enfermedad asociada con niveles elevados de IgE”, especialmente eccema; a los 5 años estas asociaciones habían desaparecido. Si bien estas asociaciones eran débiles a los 2 años, los autores sugieren que en los nacidos por cesárea la 2'FL y los demás oligosacáridos dependientes de la FUT2 estarían involucrados en la susceptibilidad al desarrollo de eccema con niveles altos de IgE. El nacimiento por cesárea sería un factor de riesgo para algunas patologías y es posible que la microbiota adquirida en los primeros días después del parto juegue un papel importante. El efecto preventivo de la 2'FL frente a la alergia observado a los 5 años en los nacidos por cesárea, no fue observado en los nacidos por parto vaginal. Los oligosacáridos dependientes de la FUT2 están asociados con el establecimiento de una microbiota con desarrollo importante de *B. longum ssp infantis*, que estimula la función de barrera de los enterocitos y ejerce capacidades antiinflamatorias.

Los individuos con mutaciones que dejan inactivo al gen *FUT2* (mutaciones null) (no-secretores) tienen en general mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas e inflamatorias del tubo digestivo, pero también exhiben mayor captación y absorción de vitamina B12 y niveles aumentados de protección frente a algunos patógenos. Por lo tanto, el que el gen *FUT2* esté activo o no, ejerce efectos positivos, pero también otros potencialmente negativos; la calidad del entorno en que se desarrollan los lactantes, incluyendo los HMOs que reciben con la leche materna, pueden modular la forma en que su sistema inmune reacciona frente a estímulos de diversa calidad.

Seppo y cols.³² mostraron que el antígeno Lewis X está asociado con la síntesis de LNFP III pero no tiene relación con la actividad de la FUT2 (carácter secretor) y está ligado con la protección que la leche materna confiere frente a la APLV. En esta investigación, fue estudiada leche obtenida tempranamente de 41 madres cuyos hijos (mediana 1,0 meses de vida) no desarrollaron APLV, y leche de 39 madres cuyos hijos (mediana 1,4 meses de vida) desarrollaron APLV. La APLV fue verificada a los 6 meses mediante confrontaciones por vía oral; los HMOs de ambos grupos fueron comparados y relacionados con la presencia de alergia. El estado secretor asociado con actividad de la FUT2 no se correlacionó con el desarrollo de APLV ($p = 0,38$). La leche de las madres cuyos hijos desarrollaron APLV tenía niveles más bajos de 6'SL ($p = 0,019$), DSLNT ($p = 0,028$), LNFP I ($p = 0,021$) y LNFP III ($p = 0,00036$) en comparación con la leche de las madres de hijos que no desarrollaron APLV. En el análisis estadístico sólo el nivel de LNFP III era más bajo en la leche de las madres cuyos hijos desarrollaron APLV ($< 29 \mu\text{M}$ vs $57 \mu\text{M}$; IC95% 11-43; p ajustado: 0,0069). Las madres de los lactantes que desarrollaron APLV de inicio tardío eran portadoras del carácter secretor. En contraste, ninguna de las madres cuyos lactantes desarrollaron cualquier forma de APLV con reacciones alérgicas inmediatas portaban este carácter. En este estudio no se registraron los antecedentes de cesárea, aunque se ha sugerido que Lewis X asociado con

LNFP III y no el estado secretor, estarían involucrados con la protección frente a la APLV²⁸. En la mucosa intestinal de los lactantes, los HMOs se unirían a las células dendríticas tanto al inicio de las reacciones normales y patológicas de las que estas últimas participan en la génesis de las alergias. La leche materna representa una mezcla de moléculas capaces de modular el comienzo y la evolución de los procesos de inmunidad.

La mayor parte de las bacterias causantes de episodios de diarrea son Gram-negativas que activan procesos inflamatorios o secretorios intestinales mediante la liberación de lipopolisacárido (LPS). En la superficie de los enterocitos el LPS se une a un receptor específico formado por la proteína que liga LPS (LBP, lipopolisaccharide-binding protein), el TLR 4, CD14 y el antígeno linfocitario⁹⁶. CD14 es importante para el reconocimiento del LPS por los enterocitos y participa en la cascada de reacciones que desencadenan los episodios de diarrea. Los HMOs, y en especial la 2'FL, atenúan las señales que inician el proceso inflamatorio porque bloquean la LBP y la liberación de CD14 y de IL-8⁶⁷. En la membrana plasmática de los enterocitos la 2'FL estimula la síntesis de citoquinas supresoras de señales, la fosforilación de sus transductores y del activador de señales tipo 3; además suprime la expresión de CD14 y la liberación de IL-8. En un modelo de diarrea por *E. coli* enteroadherente e invasora (AIEC) en ratones, la 2'FL disminuyó parcialmente el impacto metabólico negativo de la infección, evitó su baja de peso y el acortamiento del colon. La administración previa de 2'FL disminuyó la expresión del ARNm para CD14 en las criptas intestinales y había menos AIEC⁶⁷. Esta inflamación menos intensa asociada con la presencia de 2'FL significa que este oligosacárido es parte del grupo de moléculas de la leche materna que refuerzan la inmunidad innata. Los HMOs protegen también de la colonización del recién nacido por el estreptococo B, causa de morbilidad y mortalidad en lactantes; las madres Lewis+ están colonizadas por estreptococo B con menor frecuencia sin relación con el carácter secretor; el oligosacárido más efectivo en este proceso fue LNDFH⁶⁸. Los oligosacáridos sialilados fueron sólo parcialmente responsables del bloqueo de la unión en el árbol urinario de los HMOs con *Escherichia coli* enterotoxigénica y uropatogénica de origen humano, lo que nuevamente pone de relieve el significado funcional del 1% de oligosacáridos excretados en la orina⁶⁹.

Un estudio reciente incorporó 200 madres con hijos con menos de 1.500 gramos de peso al nacer, que debían haber sido amamantados por a lo menos 28 días. Se conservaron alícuotas de su leche se midió en ellas la concentración absoluta y se calcularon las proporciones relativas de 2'FL, 3'FL, 3'SL, LNT, LNnT, LNFP1, LNFP2 y LNFP3, sialil LNTb, LSTc, DFLNT, DSLNT, FLNH, DFLNH, FDSLNH y DSLNH. DSLNT estaba disminuida significativamente en los prematuros con NEC (etapa Bell 2-3) ($p = 0,001$). No hubo diferencias para la suma de los demás HMOs. Este oligosacárido sirvió de marcador para el riesgo de NEC y podría servir a futuro como un modelo para proponer tratamientos⁷⁰.

En conclusión, los HMOs ejercen numerosos efectos en aspectos funcionales tan variados como la maduración de las funciones del tubo digestivo, el crecimiento selectivo de componentes de la microbiota residente y actividades antimicrobianas locales y sistémicas durante los primeros meses de vida del lactante. Es probable que participen también en el control de funciones metabólicas del epitelio intestinal y en este sentido intervengan en la absorción de nutrientes y su utilización sistémica. Lo notable es que todos estos procesos, que son altamente selectivos, se producen con la mayor parte de estas moléculas, permanecen en el lumen del tubo digestivo y son excretadas cuantitativamente en las heces, especialmente en los primeros meses de vida, antes de la instalación de la microbiota residente. Esto significa que sus efectos probablemente se produzcan a través de contactos con receptores en los enterocitos, la modulación de las poblaciones bacterianas y contactos con diversas poblaciones de linfocitos de la lámina propia, especialmente las células dendríticas. Por otra parte, el estímulo que representan las bacterias intestinales induce a los linfocitos a sintetizar moléculas que pueden actuar a distancia; por ejemplo, serotonina e histamina a partir de triptófano e histamina que son neurotransmisores a nivel central, citoquinas y otros mensajeros. Se ha propuesto que los HMOs pueden estar actuando sobre el feto incluso durante el embarazo. Observaciones clínicas deberían ayudar a clarificar estos aspectos.

Conflicto de intereses. Sí. El Dr. Oscar Brunser es Director Médico (RMA) de Nutrición Infantil en Nestlé de Chile y Representante en Chile del Nestlé Nutrition Institute, Vevey, Suiza.

BIBLIOGRAFÍA

- Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 2012; 22: 1147-1162.
- Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, et al. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1589-1596.
- Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J Nutr* 2000; 130: 3014-3020.
- Dotz V, Rudloff S, Blank D, Lochnit G, et al. 13C-labeled oligosaccharides in breastfed infants' urine: individual, structure- and time-dependent differences in the excretion. *Glycobiology* 2014; 24: 185-194.
- Dotz V, Rudloff S, Meyer C, Lochnit G, et al. Metabolic fate of neutral human milk oligosaccharides in exclusively breast-fed infants. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59: 355-364.
- Dotz V, Adam R, Lochnit G, Schroten H, et al. Neutral oligosaccharides in feces of breastfed and formula-fed infants at different ages. *Glycobiology* 2016; 26: 1308-1316.
- Marriage BJ, Buck RH, Goehring KC, Oliver JS, et al. 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.
- Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 565-576.
- Dominguez-Bello M, Costello E, Contreras M, Magris M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 11971-11975.
- Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 2015; 17: 690-703.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 61-67.
- Roger LC, Costabile A, Holland DT, Hoyle L, et al. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology* 2010; 156(Pt 11): 3329-3341.
- Azad MB, Konya T, Persaud RR, Guttman DS, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG* 2016; 123: 983-993.
- Rautava S. Microbial composition of the initial colonization of newborns. In: Isolauri E, Sherman PM, Walker WA, eds. *Intestinal microbiome: functional aspects in health and disease*. Nestle Nutr Inst Workshop Ser. Vevey, Nestec/Basilea, S Karger AG 2017; 11-21.
- Marcobal A, Barboza M, Sonnenburg ED, Pudlo N, et al. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe* 2011; 10: 507-514.
- Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr* 2012; 3: 383S-391S.
- Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J Biol Chem* 2011; 286: 34583-34592.
- Garrido D, Ruiz-Moyano S, Kirmiz N, Davis JC, et al. A novel gene cluster allows preferential utilization of fucosylated milk oligosaccharides in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* SC596. *Sci Rep* 2016; 6: 35045-35062.
- Bunesova V, Lacroix C, Schwab C. Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium kashiwanohense*. *BMC Microbiology* 2016; 16: 248-260.
- Hoeflinger JL, Davis SR, Chow J, Miller MJ. In vitro impact of human milk oligosaccharides on Enterobacteriaceae growth. *J Agric Food Chem* 2015; 63: 3295-3302.
- Marcobal A, Sonnenburg JL. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 Suppl 4: 12-15.
- Wang M, Li M, Wu S, Lebrilla CB, et al. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015; 60: 825-833.
- Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 2011; 149: 88-105.
- Garrido D, Dallas DC, Mills DA. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology* 2013; 159(Pt 4): 649-664.
- Imbert-Marcille BM, Barbé L, Dupé M, Le Moullac-Vaidye

- B, et al. A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J Infect Dis* 2014; 209: 1227-1230.
26. Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, et al. A homozygous nonsense mutation (428G->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol* 2005; 79: 15351-15355.
27. Lindén S, Mahdavi J, Semino-Mora C, Olsen C, et al. Role of ABO secretor status in mucosal innate immunity and *H. pylori* infection. *PLoS Pathog* 2008; 4(1): e2.
28. Smyth DJ, Cooper JD, Howson JM, Clarke P, et al. FUT2 nonsecretor status links type 1 diabetes susceptibility and resistance to infection. *Diabetes* 2011; 60: 3081-3084.
29. Rausch P, Rehman A, Künzel S, Häsler R, et al. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 19030-19035.
30. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, et al. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* 2004; 14: 253-263.
31. Morrow AL, Meinzen-Derr J, Huang P, Schibler KR, et al. Fucosyltransferase 2 non-secretor and low secretor status predicts severe outcomes in premature infants. *J Pediatr* 2011; 158: 745-751.
32. Seppo AE, Autran CA, Bode L, Järvinen KM. Human milk oligosaccharides and development of cow's milk allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139: 708-711.
33. Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, Popovic M, et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 2015; 3: 13-24.
34. Davis JC, Totten SM, Huang JO, Nagshbandi S, et al. Identification of oligosaccharides in feces of breast-fed infants and their correlation with the gut microbial community. *Mol Cell Proteomics* 2016; 15: 2987-3002.
35. Smith-Brown P, Morrison M, Krause L, Davies PS. Mothers secretor status affects development of childrens microbiota composition and function: a pilot study. *PLoS One* 2016; 11: e0161211.
36. Davis JC, Lewis ZT, Krishnan S, Bernstein RM, et al. Growth and morbidity of Gambian infants are influenced by maternal milk oligosaccharides and infant gut microbiota. *Sci Rep* 2017; 7: 40466. doi: 10.1038/s rep 40466.
37. Elison E, Vigsnaes LK, Rindom Krogsgaard L, Rasmussen J, et al. Oral supplementation of healthy adults with 2'-O-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose is well tolerated and shifts the intestinal microbiota. *Br J Nutr* 2016; 116: 1356-1368.
38. Tan M, Jiang X. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000983.
39. Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev* 2015; 91: 619-622.
40. 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: 14112-14120.
41. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, et al. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* 2004; 14: 253-263.
42. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 37-58.
43. Yu ZT, Nanthakumar NN, Newburg DS. The Human Milk Oligosaccharide 2'-fucosyllactose quenches *Campylobacter jejuni*-induced inflammation in human epithelial cells Hep-2 and HT-29 and in mouse intestinal mucosa. *J Nutr* 2016; 146: 1980-1990.
44. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* 2004; 145: 297-303.
45. Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, et al. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes* 2012; 3: 121-134.
46. Nguyen TT, Kim JW, Park JS, Hwang KH, Jang TS, Kim CH, Kim D. Identification of oligosaccharides in human milk bound onto the toxin A carbohydrate binding site of *Clostridium difficile*. *J Microbiol Biotechnol* 2016; 26: 659-665.
47. Cilieborg MS, Sangild PT, Jensen ML, Østergaard MV, et al. α 1,2-Fucosyllactose does not improve intestinal function or prevent *Escherichia coli* F18 diarrhea in newborn pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; 64: 310-318.
48. Henrik BM, Yao XD, Nassert L, Roozrogooushneh A, et al. Breastfeeding behaviors and the innate immune system of human milk: working together to protect infants against inflammation, HIV-1 and other infections. *Front Immunol* 2017;8: 1631-1644.
49. Kuhn L, Kim HY, Hsiao L, Nissan C, 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.
50. Van Niekerk E, Autran CA, Nel DG, Kirsten GF, et al. 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 infants. *J Nutr* 2014 Aug; 144(8): 1227-1233.
51. The Breastfeeding and HIV International Transmission Group. HIV transmission through breastfeeding. A review of available evidence. Geneva: WHO, UNICEF, UNAIDS, UNFPA, 1-46. 2004
52. Rockx BHG, Vennema H, Hoebe CJHP, Duizer E, et al. Association of histo-blood Group antigens and susceptibility to norovirus infection. *J Infect Dis* 2005; 191: 749-754.
53. Koromyslova AD, Leuthold MM, Bowler MW, Hansman GS. The sweet quartet: Binding of fucose to the norovirus capsid. *Virology* 2015; 483: 203-208.
54. Weichert S, Koromyslova A, Singh BK, Hansman S, et al. Structural basis for norovirus inhibition by human milk oligosaccharides. *J Virol* 2016; 90: 4843-4848.
55. Koromyslova A, Tripathi S, Morozov V, Schrotten H, et al. Human norovirus inhibition by a human milk oligosaccharide. *Virology* 2017; 508: 81-89.
56. Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, et al. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis* 2003; 188: 19-31.
57. Etzold S, Bode L. Glycan-dependent viral infection in infants and the role of human milk oligosaccharides. *Curr Opin Virol* 2014; 7: 101-107.
58. Hester SN, Chen X, Li M, Monaco MH, et al. Human milk oligosaccharides inhibit rotavirus infectivity in vitro and in acutely infected piglets. *Br J Nutr* 2013; 110: 1233-1242.
59. Li M, Monaco MH, Wang M, Comstock SS, et al. Human

- milk oligosaccharides shorten rotavirus-induced diarrhea and modulate piglet mucosal immunity and colonic microbiota. *ISME J* 2014; 8: 1609-1620.
60. Laucirica DR, Triantis V, Schoemaker R, Estes MK, et al. Milk oligosaccharides inhibit human rotavirus infectivity in MA104 cells. *J Nutr* 2017; 147: 1709-1714.
 61. Yu Y, Mishra S, Song X, Lasanajak Y, et al. Functional glycomic analysis of human milk glycans reveals the presence of virus receptors and embryonic stem cell biomarkers. *J Biol Chem* 2012; 287: 44784-44799.
 62. Jantscher-Krenn E, Lauwaet T, Bliss LA, Reed SL, et al. Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity in vitro. *Br J Nutr* 2012 Nov 28; 108: 1839-1846.
 63. Prieto PA. In vitro and clinical experiences with a human milk oligosaccharide, lacto-N-neotetraose, and fructooligosaccharides. *Foods Food Ingredients J Jpn* 2005; 210: 1021-1030.
 64. Kulinich A, Liu L. Human milk oligosaccharides: The role in the fine-tuning of innate immune responses. *Carbohydr Res* 2016; 432: 62-70.
 65. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annu Rev Ecol Evol* 2012; 43: 385-406.
 66. Sprenger N, Odenwald H, Kukkonen AK, Kuitunen M, et al. FUT2-dependent breast milk oligosaccharides and allergy at 2 and 5 years of age in infants with high hereditary allergy risk. *Eur J Nutr* 2017; 56: 1293-1301.
 67. He Y, Liu S, Kling DE, Leone S, et al. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. *Gut* 2016; 65: 33-46.
 68. Andreas NJ, Al-Khalidi A, Jaiteh M, Clarke E, et al. Role of human milk oligosaccharides in Group B *Streptococcus* colonisation. *Clin Transl Immunology* 2016; 5: e99-e104.
 69. Martín-Sosa S, Martín M-J, Hueso P. The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *J Nutr* 2002; 132: 3067-3072.
 70. Autran CA, Kellman BP, Kim JH, Asztalos E, et al. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Gut*. 2018; 67: 1064-1070.