



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

TÍTULO:

**OLIGOSACÁRIDOS DE LA LECHE MATERNA EN MUJERES
PERUANAS CON HIJOS CON MUY BAJO PESO AL NACER**

**HUMAN MILK OLIGOSACCHARIDES IN PERUVIAN WOMEN WITH
VERY LOW BIRTH WEIGHT INFANTS**

ALUMNOS:

Víctor Daniel Sabyñ Torres Roldán

Lourdes Meritxell Urtecho Suárez

ASESORES:

Theresa Ochoa Woodell

César Cárcamo Cavagnaro

2018

Tabla de contenido

Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Materiales y Métodos	6
Resultados	9
Discusión	11
Declaración de conflictos de interés	15
Agradecimiento	15
Referencias bibliográficas	15
Anexos	18

Resumen

Antecedentes: Uno de los componentes más abundantes de la leche materna son los oligosacáridos. Estas moléculas han probado efecto prebiótico, antimicrobiano y antiadherente, siendo un potencial agente protector frente a infecciones del período neonatal, entre ellos, la sepsis neonatal.

Objetivos: Describir la composición y características de los oligosacáridos de la leche materna en madres peruanas con hijos con muy bajo peso al nacer e identificar si algún oligosacárido está asociado a menor riesgo de sepsis tardía.

Materiales y métodos: Es un análisis de datos secundarios tomados de un ensayo clínico aleatorizado. Se realizó un estudio de tipo cohorte retrospectiva, donde participaron neonatos con peso al nacer de <1500 gr, con al menos una muestra de leche y seguimiento completo por 30 días. Los oligosacáridos fueron medidos por cromatografía líquida de alta presión. Los eventos de interés se evaluaron mediante un análisis de supervivencia usando análisis factorial para resumir las variables.

Resultados: Se incluyeron 153 sujetos con 208 muestras de leche entre calostro y leche madura. Los oligosacáridos más abundantes fueron 2'-fucosillactosa, lacto-N-fucopentosa I y lacto-N-tetraosa. La frecuencia de fenotipo Secretor fue de 93%. Se encontró que el fenotipo Secretor tiene mayor concentración total de oligosacáridos que el fenotipo No Secretor (11.45 vs 7.78 gr/L). Un factor correlacionado con el oligosacárido fucosil- disialillacto-N-hexaosa (FDSLNH) parece tener un efecto protector frente a sepsis neonatal tardía.

Conclusiones: Se halló una posible asociación entre FDSLNH y menor riesgo de sepsis tardía que debe ser confirmada por futuros estudios.

Palabras clave o keywords [MeSH]: Neonatal sepsis; Oligosaccharides; Milk, Human

Abstract

Background: Oligosaccharides are one of the most abundant components in human milk. They have proven prebiotic, antimicrobial and antiadhesive effects, and are a potential protective agent against neonatal infections, among them, late onset sepsis.

Objectives: This study aims to describe the composition and characteristics of human milk oligosaccharides (HMO) in Peruvian mothers of very low birth weight infants and identify a possible association to a lower incidence of late onset sepsis.

Design: This is a secondary data analysis from a randomized clinical trial. We conducted a retrospective cohort, where participants were neonates with very low birth weight (<1500 gr) with at least one milk sample and completed follow-up for 30 days. The oligosaccharides were measured by high-performance liquid chromatography. The outcomes were evaluated through survival analysis using factor analysis to summarize variables.

Results: We included 153 mother-infant pairs and their 208 milk samples. The most abundant oligosaccharides were 2' -fucosyllactose, lacto-N-fucopentaose and lacto-N-tetraose. The frequency of Secretor phenotype was 93%. Secretor phenotype had higher amounts of total oligosaccharides than Non Secretors (11.45 vs 7.78 gr/L). One of the factors, which was tightly correlated to the oligosaccharide fucosyl-disialyl-lacto-N-hexaose (FDSLNH) shows a protective effect against late onset sepsis.

Conclusions: We found a possible association between the oligosaccharide FDSLNH and a lower risk of developing late onset neonatal sepsis that needs to be confirmed in future research.

Introducción

La sepsis neonatal es un problema de salud global que contribuye significativamente con la morbilidad y mortalidad infantil. La sepsis neonatal tardía, aquella que se presenta luego de las primeras 72 horas de vida, está asociada tanto a infecciones adquiridas en la comunidad como intrahospitalarias (1). Por otro lado, la leche materna ha demostrado poseer efectos protectores contra sepsis neonatal, enterocolitis necrosante (NEC), y otras infecciones, especialmente en bebés pretérminos o con muy bajo peso al nacer. (2) Este efecto protector puede deberse a múltiples componentes de la leche materna, incluyendo inmunoglobulinas, citoquinas, lactoferrina y, de acuerdo a últimas investigaciones, oligosacáridos.(3)

Los oligosacáridos de la leche materna (*HMO* por sus siglas en inglés, *human milk oligosaccharides*) son el tercer componente más abundante de la leche y poseen un rol fundamental en la función protectora de ésta. Sus efectos biológicos más relevantes son: 1) Prebióticos, dan forma al microbioma intestinal al servir como sustratos metabólicos para microorganismos entéricos seleccionados como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (4); 2) Anti-adhesivos, bloquean la adhesión de bacterias, virus y protozoarios o sus toxinas a las células epiteliales. Esto se basa en la homología estructural entre el HMO y el receptor de la célula huésped. Algunos incluyen a patógenos relacionados con sepsis como *S. pneumoniae* y *L. monocytogenes* (5) y a patógenos entéricos como rotavirus, norovirus, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* enteropatógena, *Entamoeba histolytica* y *Clostridium perfringens*, (6,7); 3) Antimicrobianos, afectan directamente la proliferación de bacterias y hongos. Existe un efecto bacteriostático hacia *Streptococcus* Grupo B, y disminución dosis-dependiente de la invasión por *Candida albicans* en células epiteliales intestinales de prematuros (7,8). 4) Inmunomoduladores intracelulares y extracelulares, que alteran la respuesta del huésped, un ejemplo de esto son las

expresiones genéticas que conducen a cambios en la superficie celular, suprimen vías apoptóticas, reducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos, así como otros mecanismos adicionales. (7,9)

Los oligosacáridos son parte de una familia amplia y heterogénea de carbohidratos, con más de 200 diferentes tipos identificados en la leche materna hasta la actualidad. (4) Son uno de los principales componentes de la leche materna y su concentración habitual oscila entre 5-15 g/L de leche, pudiendo ser mayor en el calostro o en mamás con niños pretérmino (10). Esta concentración es incluso mayor a la de las proteínas, las cuales se encuentran concentradas en aproximadamente 8 g/L (11). Su composición es muy variable, tanto entre madres como en la misma madre dentro de diferentes periodos de la lactancia. La variación mejor caracterizada se da por la fucosilación de los oligosacáridos y depende del estado secretor (Se) o del estado Lewis (Le) (10). El fenotipo Secretor (Se) se refiere a la actividad de dos locus genéticos que codifican a la α 1-2-fucosiltransferasa (conocida como FUT2), mientras que el fenotipo Lewis (Le) a la actividad de la α 1-3/4-fucosiltransferasa (FUT 3). Además, estos varían en tipo y cantidad entre madres de niños a término y pretérmino. (12)

Los HMO están compuestos por los 5 monosacáridos: glucosa (Glc), galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) y ácido siálico (Sia). Todos los HMO contienen lactosa en su extremo reductor y pueden ser elongados en ese extremo con extensiones de tipo 1 (adicionando lacto-N-biosa por medio de un enlace β 1-3 o β 1-6) o extensiones de tipo 2 (adicionando N-acetillactosamina). Cuando se adiciona una extensión de tipo 1, la elongación suele terminar; por el contrario, las extensiones de tipo 2 pueden continuar la elongación. De igual modo, se puede elongar la cadena con fucosa o con ácido siálico. La fucosilación puede suceder en enlaces α 1-2, α 1-3 o α 1-4, mientras que la sialilación en enlaces α 2-3 o α 2-6 (10,11).

Algunos estudios previos sugieren que ciertos tipos de oligosacáridos podrían interferir en la patogénesis de la sepsis tardía, ya sea modulando la respuesta inmune o previniendo invasiones locales o sistémicas de patógenos típicos asociados a sepsis. (7,9)

Este estudio tiene como objetivo describir la composición y características de los oligosacáridos de la leche materna en madres peruanas con hijos con muy bajo peso al nacer e identificar qué oligosacáridos de la leche materna están asociados a menor riesgo de sepsis tardía (probable o confirmada) en esta población.

Materiales y Métodos

El presente estudio es un análisis de datos secundarios tomados de un ensayo clínico aleatorizado controlado de suplemento de lactoferrina bovina para la prevención de sepsis tardía en neonatos del grupo NEOLACTO (Ver inscripción en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01525316>).

El registro de participantes se llevó a cabo desde mayo del 2012 hasta septiembre del 2014 en la Unidad de Neonatología de 3 hospitales de atención terciaria en Lima, Perú (Hospital Cayetano Heredia, Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen y Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren). Como parte del ensayo clínico se recolectaron muestras de leche (2-3 ml) desde el nacimiento hasta el séptimo día (calostro) y al primer mes (leche madura).

Los recién nacidos fueron aleatorizados para recibir lactoferrina o placebo por 8 semanas (200 mg/kg/día). Asimismo, fueron seguidos diariamente para la evaluación de una posible sepsis. Todos los episodios fueron analizados para determinar si corresponden a un caso de sepsis posible, probable o confirmada, basado en los criterios Haque. (1) El consumo de leche (dosis de leche materna) fue registrado durante el período de hospitalización.

El actual es un estudio observacional de tipo cohorte retrospectiva. Los oligosacáridos fueron evaluados mediante un análisis factorial. Se tomaron como variables independientes los factores obtenidos de la concentración de los principales oligosacáridos de la leche materna y como variables dependientes el tiempo al evento de sepsis neonatal tardía (probable o confirmada), enterocolitis necrosante estadio Bell 2 o 3 o muerte por sepsis.

El estudio original (NEOLACTO) incluyó a recién nacidos con peso entre 500 y 2000 gramos que fueron referidos dentro de las primeras 72 horas de vida a la Unidad de Cuidados Intermedios o Unidad de Cuidados Intensivos de los 3 hospitales mencionados y excluyó a aquellos con problemas gastrointestinales que no permitieran la ingesta oral (Ej. gastrosquisis, onfalocele, etc), que padecieran de condiciones predisponentes que afecten significativamente el crecimiento y desarrollo (Ej. cromosomopatías, anomalías estructurales del sistema nervioso central, etc), que tuvieron historia familiar de alergia a la proteína de la leche de vaca y a aquellos que vivieran lejos de Lima.

El presente estudio incluyó a aquellos recién nacidos con peso al nacer entre 500 y 1500 gramos que contaron con 1 o más muestras de leche en cantidad igual o mayor a 50 micro litros y que hubieran completado al menos 30 días de seguimiento. En tanto, para el análisis factorial, se excluyeron a aquellos neonatos que no consumieron leche ningún día dentro de los primeros 7 días de vida y a aquellos que consumieron leche ningún día dentro de los primeros 30 días para las muestras de calostro y leche madura, respectivamente. Debido a que el ensayo clínico no logró demostrar una diferencia significativa entre el grupo de intervención con lactoferrina y el control en prevención de sepsis neonatal tardía, todos los participantes fueron incluidos para este estudio.

El análisis de los oligosacáridos se realizó en el laboratorio Bode Lab de la UCSD (*University of California San Diego*), usando Cromatografía Líquida de Alta Presión con Detección por Fluorescencia (HPLC-FL, por sus siglas en inglés) al que se añadió rafinosa en cada muestra de leche como un estándar interno para la cuantificación absoluta de cada oligosacárido (13). Esta técnica permite identificar 19 oligosacáridos distintos señalados en la Tabla 1. El fenotipo Secretor fue definido de acuerdo a la presencia los oligosacáridos 2'FL o LNFP, siendo éstos los mejores marcadores. (14) Las concentraciones de los HMO fueron examinadas en microgramos por mililitro (mcg/mL) usando medias como unidad de medida central, intervalos de confianza al 95% y, en algunos casos desviación estándar y porcentajes. Se estimó el índice de diversidad de Simpson como la suma recíproca del cuadrado de las abundancias relativas de cada uno de los oligosacáridos. Se examinó una posible relación entre la concentración de oligosacáridos y la sepsis neonatal tardía mediante análisis de supervivencia. De igual manera, se evaluó una posible relación con infecciones severas, evaluadas mediante un evento o resultado compuesto que incluyó sepsis neonatal tardía, enterocolitis necrosante y muerte por sepsis. Después de excluir a los sujetos que no consumieron leche materna, definido ya en los criterios de elegibilidad, se analizaron paralelamente las muestras de calostro (n=99) y las de leche madura (n=100). Al tratarse de 19 oligosacáridos distintos y 2 eventos de interés, se minimizaron el número de comparaciones a través del análisis factorial. Este método permite resumir las variables en factores que explican la mayor variación posible de los datos, sin perder información. Se predeterminaron 3 factores que tuvieran un *eigenvalue* mayor a la unidad. El *eigenvalue* o auto valor representa el total de la varianza explicada por cada factor.

El ensayo clínico NEOLACTO fue aprobado por los comités de ética de “University of Texas Health Science Center” en Houston, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), y los

comités de ética de los 3 hospitales participantes. Los padres brindaron su consentimiento informado para participar del estudio y para usar las muestras biológicas para futuros estudios relacionados a los factores protectores de la leche materna. El presente estudio fue revisado y exonerado por el comité de ética de la UPCH.

Resultados

En total, se analizaron 208 muestras de leche materna por cromatografía líquida para hallar las concentraciones individuales de los HMO. De estas, 106 correspondían a calostro y 102 a leche madura. De los 414 recién nacidos registrados en el ensayo clínico NEOLACTO, 256 nacieron con peso menor a 1500 gr y, finalmente, 153 cumplieron con los criterios de elegibilidad, de los cuales 55 tuvieron muestras tanto de calostro como de leche madura.

De estos 153 individuos, 39 (25%) corresponden a niños con extremado bajo peso al nacer (<1000 gr). La mayoría (83%) nació por parto abdominal. El 99% de los recién nacidos fueron pretérmino, siendo la media 29.4 ± 1.5 semanas de edad gestacional. Para 106 (69%) individuos el peso fue adecuado para su edad gestacional. El 93% de los sujetos cumplen con las características del fenotipo Secreto. Las características del subgrupo de 55 individuos que contaban con ambas muestras fueron muy similares al total. (Tabla 2)

Se analizó el total de las muestras (n=208) y se halló que 4 oligosacáridos tienen la mayor concentración: 2'-fucosillactosa o 2'FL con 3087 mcg/mL, lacto-N-fucopentosa I o LNFP I con 1943 mcg/mL, difucosillacto-N-tetraosa o DFLNT con 1011 mcg/mL y lacto-N-tetraosa o LNT con 881. (Tabla 3)

La media de la concentración total de HMO en todas las muestras de calostro (n=106) fue de 11.3 gr/L. Al analizar su composición, el oligosacárido más abundante fue 2'-fucosillactosa o 2'FL

(41%), seguido de lacto-N-fucopentosa I o LNFP I (14%) y en tercer lugar lacto-N-tetraosa o LNT (6%). (Gráfico N° 1) Por otro lado, la media de la concentración total de HMO en leche madura (n=102) fue de 11.15 gr/L. El oligosacárido con mayor porcentaje fue 2'FL (34%), en segundo lugar, LNFP I (14%) y en tercer lugar LNT (11%). (Gráfico N° 2)

Al comparar la cantidad de oligosacáridos en el grupo Secretor y el No Secretor, se observa mayor concentración en el grupo Secretor (11.45 gr/L IC 95% [11.35-11.54] vs 7.78 gr/L IC 95% [6.78-8.78]; $p < 0.0001$).

En aquellos individuos que contaban con ambas muestras (n=55), se examinaron las diferencias de las concentraciones de cada oligosacárido entre las muestras de calostro y leche madura (Tabla N°4). Se observaron mayores concentraciones de 2'-fucosillactosa o 2'FL (3544 ± 179 vs 2819 ± 176) y sialil-lacto-N-tetraosa c o LSTc (672 ± 31 vs 347 ± 23) en calostro con respecto a leche madura. Por su parte, los oligosacáridos lacto-N-tetraosa o LNT (1068 ± 76 vs 661 ± 66), sialil-lacto-N-tetraosa b o LSTb (108 ± 11 vs 50 ± 6) y fucosil-disialil-lacto-N-hexaosa o FDSLNH (102 ± 11 vs 61 ± 7) se encontraron en mayores concentraciones en leche madura en comparación con calostro. Se examinó, además, la media de la diversidad en las muestras de calostro y leche madura. Se halló que la diversidad en leche madura es mayor que en calostro (5.49 ± 1.90 vs 4.55 ± 1.46 , $p = 0.002$ mediante prueba t Student para muestras con varianzas similares).

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la prueba de Cox aplicada para cada uno de los factores obtenidos en calostro y leche madura, para los eventos sepsis tardía y el evento o resultado compuesto por enterocolitis necrosante, sepsis tardía y muerte por sepsis en neonatos con muy bajo peso al nacer. Se observa que el factor 3 de las muestras de calostro tiene razones de peligro (HR: *Hazard Ratio*) de 0.63 (IC 95% [0.41-0.97]; $p < 0.05$) para sepsis tardía y 0.67 (IC

95% [0.46-0.96]; $p < 0.05$) para el resultado compuesto. Asimismo, dicho factor tiene una correlación de 0.63 con el oligosacárido FDSLNH, lo que podría suponer un efecto protector (Tabla 6). Los demás factores no muestran diferencias significativas.

Discusión

En la cohorte estudiada, se halló que el 93% de las muestras corresponden al fenotipo Secretor. Otros estudios han reportado que la proporción de individuos que son categorizados como Secretores es variable y varía geográficamente, aunque siempre predomina sobre el fenotipo No Secretor (5,14,15,16). Este fenotipo suele ser más común en población de raza africana y latinoamericana que en los caucásicos. Así, un estudio de variación geográfica publicado por Michelle McGuire et al. reportó el 2017 un 96% de secretores en población peruana ($n=43$), en mujeres que vivían en un área periurbana de Lima comparado con un 98% de secretores en Ghana y un 65% en Estados Unidos (17). Bode et al, reportó que el 70% de mujeres caucásicas presentan el gen secretor (7). Morrow et al, realizó un estudio ontogénico en recién nacidos con muy bajo peso al nacer y determinó que la expresión del gen Secretor aumenta durante el período postnatal y, el estado No Secretor está asociado a mayor riesgo de sepsis por gram negativos, NEC y muerte por sepsis. (15) No fue posible observar estas diferencias en nuestra cohorte, debido a que sólo tuvimos 10 sujetos con fenotipo No Secretor y sólo 2 de ellos desarrollaron sepsis neonatal. Tampoco fue posible clasificar las muestras de acuerdo al fenotipo Lewis, debido a que el mejor marcador es el oligosacárido lacto-N-neodifucohexaosa II (LNDFH II), el cual no fue medido para este estudio. (14)

Se encontró que los HMO con mayor concentración en esta cohorte, tanto en calostro como en leche madura, fueron 2-fucosillactosa (2'FL), lacto-N-fucopentosa I (LNFP I) y lacto-N-tetraosa (LNT), lo cual concuerda con lo reportado por otros investigadores (18). Las cantidades de éstos

oligosacáridos son parecidas a las reportadas en otros estudios en diferentes poblaciones. De esta manera, Kunz et al. reporta en población alemana que el oligosacárido LNFP I se encuentra en los rangos de 1.2-1.7 gr/L y el LNT entre 0.5-1.5 g/L. En nuestra cohorte, el LNFP I varía entre 1.8-2.1 g/L y el LNT entre 0.8-9.5 g/L. (19) Alderete et al, 2015 reportó en neonatos a término estadounidenses que el oligosacárido más abundante fue 2'FL, con una concentración de 2.8 g/L (Rango intercuartílico [RIQ]: 3.7) en el primer mes de vida; sin embargo, en dicho estudio el segundo HMO con mayor concentración fue LNT con 1.4 g/L (RIQ: 1.3), seguido de LNFP II con 1.3 g/L (RIQ: 1.1) (20)

A pesar de que el estudio no evaluó la variación interpersonal en la composición de oligosacáridos, para la interpretación de los datos, es importante tener en cuenta que las madres con recién nacidos pretérmino tienen mayor variación en la composición de HMO que madres con recién nacidos a término (13). La variación intrapersonal que se obtuvo al comparar calostro con leche madura (n=55), permitió observar que algunos oligosacáridos aumentan su concentración durante el período neonatal, mientras otros disminuyen y, la mayoría, se mantiene constante. Un ejemplo se observa tomando el oligosacárido más abundante, 2'FL, que presenta una media de concentración de 3544 mcg/mL en calostro y disminuye a 2819 mcg/ml, mientras que el LNT en calostro presenta una concentración promedio de 661 mcg/mL y aumenta a 1068 mcg/mL y la mayoría de oligosacáridos se presentan en cantidades parecidas en ambas muestras. (Tabla 4)

En el presente estudio, que incluye casi en su totalidad a recién nacidos pretérmino, la cantidad total de HMO en calostro y en leche madura fue similar, con valores cercanos a 11 gr/L. Esta cantidad parece ser baja en relación a otros estudios que reportan que el calostro contiene un total de 20-23 gr/L de oligosacáridos, en tanto que la leche madura contiene una cantidad menor, 12-

15 gr/L (12, 21, 22). Esta información contrasta con Thurl et al que reporta mayor concentración de oligosacáridos en recién nacidos pretérmino (12).

Se observó una diferencia significativa ($p < 0.0001$) al comparar la cantidad de oligosacáridos en el grupo Secretor y el No Secretor, siendo 11.5 g/L y 7.8g/L respectivamente. Esta diferencia se podría explicar debido a que el fenotipo No Secretor prescinde de la enzima fucosiltransferasa 2 y, por lo tanto, de dos de los oligosacáridos más abundantes: 2'FL, LNFP I. (7,9)

Hay evidencia que sugiere que los HMO podrían ejercer un efecto protector frente a algunos agentes infecciosos, no obstante, hasta la fecha, la evidencia con estudios clínicos es escasa. Los oligosacáridos presentan mecanismos protectores que han sido bien estudiados para prevenir diarrea e infecciones intestinales como infecciones por rotavirus y *Campylobacter jejuni* (10). Además, un estudio de Idänpään-Heikkilä et al señala, en un modelo animal, que la administración de oligosacáridos puede inhibir la colonización del *Streptococcus pneumoniae* en la orofaringe y, además, actuar terapéuticamente una vez se ha desarrollado neumonía o bacteremia (23). Además, estudios sugieren que algunos HMO podrían tener un rol bacteriostático sobre el *Streptococcus agalactiae* con un comportamiento dosis - dependiente. (8) Dado que el *Streptococcus agalactiae* es uno de los patógenos más frecuentemente aislados en sepsis neonatal en Estados Unidos y Europa, esta evidencia sugiere mecanismos que podrían prevenir esta condición. Sin embargo, en Perú, las causas más frecuentes de sepsis neonatal tardía son los *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Staphylococcus aureus* y bacterias gram negativas (24).

El presente, es el primer estudio longitudinal que explora la relación entre los HMO y la sepsis neonatal tardía. El análisis factorial es un método válido para resumir las variables en factores

que mantengan la mayor cantidad de información posible. En este estudio hallamos un efecto protector del factor 3 de calostro con una razón de peligro de 0.63 (IC 95% [0.41-0.97]; $p < 0.05$). Este factor 3 está fuertemente correlacionado con el oligosacárido fucosil- disialillacto-N-hexaosa o FDSLNH, el cual, en el estudio de Alderete et al, muestra una asociación lineal positiva con el peso del niño a los 6 meses de edad. (20) Esta asociación debe ser confirmada por otros estudios.

El presente estudio cuenta con algunas limitaciones al ser un estudio retrospectivo, donde se tomó un máximo de 2 muestras de leche en el período neonatal. Asimismo, el gran número de oligosacáridos no permitió establecer asociaciones individuales por la cantidad de comparaciones necesarias para su estudio. Por otro lado, el análisis factorial es útil para la exploración inicial de los datos; no obstante, algunas limitaciones son inherentes a este tipo de análisis. Una de ellas es que se basa en la asunción de que las asociaciones son lineales, pudiendo pasar por alto alguna asociación de otro tipo. Otra limitación importante es que el análisis factorial agrupa a los oligosacáridos de acuerdo a la mayor variación lineal y no necesariamente los agrupa por alguna relación biológica o metabólica.

Por lo tanto, se recomienda un estudio prospectivo con mayor población, que incluya más latitudes geográficas, una rigurosa detección microbiológica de los agentes causales de sepsis neonatal tardía y usar la evidencia actual para seleccionar las variables de exposición.

En conclusión, se encontró que la frecuencia del fenotipo secretor fue de 93% en la población participante. Asimismo, los oligosacáridos más abundantes fueron 2-fucosillactosa (2'FL), lacto-N-fucopentosa I (LNFP I) y lacto-N-tetraosa (LNT). Además, se encontró que el fenotipo Secretor tiene mayor cantidad de oligosacáridos que el fenotipo No Secretor. Finalmente, se halló

una posible asociación entre fucosil- disialillacto-N-hexaosa (FDSLNH) y reducción del riesgo de desarrollar sepsis neonatal tardía; asociación que debe ser confirmada con futuros estudios.

Declaración de conflictos de interés

No se reportan conflictos de interés.

Agradecimiento

Queremos agradecer al Dr. Lars Bode por su participación y orientación en el desarrollo del proyecto, quien, además, permitió que las muestras de leche fueran analizadas en su laboratorio en la *University of California San Diego*.

Referencias bibliográficas

- 1) Dong Y, Speer CP. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015;100(3):F257-63..
- 2) Meinen-Derr J, Poindexter B, Wrage L, Morrow AL, Stoll B, Donovan EF. Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death. *J Perinatol.* 2009;29(1):57–62.
- 3) Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr.* 2010;156(2 Suppl):S3-7
- 4) De Leoz MLA, Wu S, Strum JS, Ninonuevo MR, Gaerlan SC, Mirmiran M, et al. A quantitative and comprehensive method to analyze human milk oligosaccharide structures in the urine and feces of infants. *Anal Bioanal Chem.* Mayo de 2013;405(12):4089–105.
- 5) De Leoz ML, Gaerlan SC, Strum JS, Dimapasoc LM, Mirmiran M, Tancredi DJ, et al. Lacto N Tetraose, Fucosylation, and Secretor Status are Highly Variable in Human Milk Oligosaccharides From Women Deliverin Preterm. *J Proteome Res.* 2012;11(9):4662–72.

- 6) Mielcarek C, Romond PC, Romond MB, Bezirtzoglou E. Modulation of bacterial translocation in mice mediated through lactose and human milk oligosaccharides. *Anaerobe*. 2011;17(6):361–6.
- 7) Bode L. Early Human Development The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev*. 2015;91(11):619–22.
- 8) Andreas NJ, Al-Khalidi A, Jaiteh M, Clarke E, Hyde MJ, Modi N, et al. Role of human milk oligosaccharides in Group B Streptococcus colonisation. *Clin Transl Immunol*. 2016;5(8):e99.
- 9) He Y, Lawlor NT, Newburg DS. Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation. *Adv Nutr*. el 1 de enero de 2016; 7(1):102–11.
- 10) Miñana IV. Oligosacáridos en la leche humana. *Acta Pediatr Española*. 2007;65(3):129–33.
- 11) Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. Septiembre de 2012; 22(9):1147–62.
- 12) Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Müller-Werner B, Jelinek J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr*. 2010;104(9):1261–1271.
- 13) Autran CA, Kellman BP, Kim JH, Asztalos E, Blood AB, Spence ECH, et al. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Gut*. 2017
- 14) Totten SM, Zivkovic AM, Wu S, Ngyuen U, Freeman SL, Ruhaak LR, et al. Comprehensive profiles of human milk oligosaccharides yield highly sensitive and specific markers for determining secretor status in lactating mothers. *J Proteome Res*. 2012;11(12):6124–33.

- 15) Morrow A, Meinzen-Derr J, Huang P, Schibler K, Cahill T, Keddache M, et al. Fucosyltransferase 2 non-secretor and low secretor status predicts severe outcomes in premature infants. *J Pediatr*. 2012;158(5):745–51.
- 16) Kunz C, Meyer C, Collado MC, Geiger L, García-Mantrana I, Bertua-Ríos B, et al. Influence of Gestational Age, Secretor, and Lewis Blood Group Status on the Oligosaccharide Content of Human Milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;64(5):789–98.
- 17) 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(5).
- 18) Kunz C, Rudloff S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr*. 1993. 82:903–12
- 19) Jantscher-Krenn E, Zhrebtsov 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(10):1417–25.
- 20) 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(6):1381–8.
- 21) Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Peila C, et al. Preterm Milk Oligosaccharides During the First Month of Lactation. *Pediatrics*. 2011;128(6):e1520–31.
- 22) Coppa G V, Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Gabrielli O. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr Suppl*. 1999; 88(430):89–94.

- 23) Idänpään-Heikkilä I, Simon PM, Zopf D, Vullo T, Cahill P, Sokol K, et al. Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* Septiembre de 1997; 176(3):704–12.
- 24) Alvarado-Gamarra G, Alcalá-Marcos KM, Abarca-Alfaro DM, Bao-Castro V. Características microbiológicas y terapéuticas de la sepsis neonatal confirmada en un hospital de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2016; 33(1):74.

Anexos

Tabla 1. Nombre y abreviatura de los oligosacáridos analizados en Bode Lab-UCSD.

Abreviatura	Nombre	Abreviatura	Nombre
2'FL	2'-fucosillactosa	LSTb	sialil-lacto-N-tetraosa b
3'FL	3'-fucosillactosa	LSTc	sialil-lacto-N-tetraosa c
LNnT	lacto-N-neotetraosa	DFLNT	difucosillacto-N-tetraosa
3'SL	3'-sialillactosa	LNH	lacto-N-hexaosa
DFLac	difucosillactosa	DSLNT	disialil-lacto-N-tetraosa
6'SL	6'-sialillactosa	FLNH	fucosillacto-N-hexaosa
LNT	lacto-N-tetraosa	DFLNH	difucosillacto-N-hexaosa
LNFP I	lacto-N-fucopentaosa	FDSLNH	fucosil- disialillacto-N-hexaosa
LNFP II	lacto-N-fucopentaosa II	DSLNH	disialillacto-N-hexaosa
LNFP III	lacto-N-fucopentaosa III		

Tabla 2. Características de los recién nacidos <1500 gr con 1 o más muestras de leche analizadas.

		Total de	
		participantes	Participantes con
		(n=153)	dos muestras (n=55)
Sexo, n(%)	Masculino	81 (53)	28(51)
	Femenino	72 (47)	27(49)
Peso al nacer, n(%)	<1000 gr	39 (25)	14 (25)
	1000-1500 gr	114 (75)	41 (75)
Tipo de parto, n(%)	Eutócico	26 (17)	7 (13)
	Abdominal	127 (83)	48 (87)
Adecuación gestacional, n(%)	AEG*	106 (69)	40 (73)
	PEG*	41 (27)	12 (22)
	GEG*	6 (4)	3 (5)
Edad gestacional (en semanas), n(%)	≥37	1 (1)	1 (1)
	32-36	36 (23)	13 (24)

	28-31	79 (52)	26 (48)
	<28	37 (24)	15 (27)
	Media (SD)	29.4 (1.5)	29.4 (2.9)
Fenotipo Secretor, n(%)		143 (93)	
Lactoferrina**, n(%)		83 (54.2)	
Eventos de interés, n(%)	Sepsis	43 (28.1)	
	NEC*	10 (6.5)	
	Muerte por sepsis	8 (5.2)	

*Siglas (AEG: Adecuado para edad gestacional; PEG: Pequeño para edad gestacional; GEG: Grande para edad gestacional; NEC: enterocolitis necrosante). **En el estudio de NEOLACTO se aleatorizaron los participantes para recibir lactoferrina o placebo. Se indica el número participantes de este estudio que recibieron lactoferrina.

Tabla 3. Cantidad total de oligosacáridos (mcg/mL) en todas las muestras (n=208).

Oligosacárido	Media	IC 95%	
2'FL	3087	2902	3272
LNFP I	1943	1813	2072
DFLNT	1011	919	1102
LNT	881	803	958
LNFP II	566	515	617
LNTnT	527	492	563
LSTc	517	480	554
6'SL	490	459	520
DFLac	425	384	466
3'SL	408	369	446
DSLNT	321	301	341
DSLNH	273	257	290
3'FL	218	201	235
DFLNH	181	163	199

FDSLNH	98	79	118
LNFP III	92	83	100
LSTb	82	69	95
FLNH	77	69	85
LNH	33	28	38

Ordenados de mayor a menor concentración

Tabla 4. Concentración (mcg/mL) de HMO en calostro y leche madura.

	Calostro (n=55)	Leche Madura (n=55)
Oligosacárido	Media (IC 95%)	Media (IC 95%)
2'FL	3544 (3192-3896)	2819 (2461-3177)
3'FL	238 (206-270)	218 (179-256)
LNnT	563 (492-633)	523 (437-610)
3'SL	442 (365-520)	394 (330-458)
DFLac	499 (393-605)	402 (335-469)
6'SL	496 (419-572)	478 (419-536)
LNT	661 (529-793)	1068 (915-1222)
LNFP I	1874 (1642-2106)	2002 (1760-2244)
LNFP II	488 (415-561)	616 (521-710)
LNFP III	96 (83-109)	84 (66-102)
LSTb	50 (39-62)	108 (86-130)
LSTc	672 (609-734)	347 (301-393)
DFLNT	862 (721-1003)	1171 (957-1386)

LNH	26 (18-34)	38 (28-49)
DSLNT	304 (267-341)	327 (283-371)
FLNH	63 (51-75)	88 (70-106)
DFLNH	155 (126-184)	203 (159-246)
FDSLNH	61 (46-75)	102 (80-124)
DSLNH	270 (240-300)	279 (243-316)

*Siglas (HMO= Human Milk Oligosaccharides, en español oligosacáridos de la leche materna)

Tabla 5. Análisis de supervivencia usando la prueba de Cox para los factores obtenidos de las concentraciones de los oligosacáridos en calostro y leche madura.

Muestra	Evento de interés				
	Sepsis tardía			Sepsis tardía, muerte por sepsis o NEC*	
Calostro (n=99)					
	Razón de Peligro		Razón de Peligro		
Factores	(IC 95%)	p	(IC 95%)	p	
1	1.00 (0.67-1.49)	0.98	1.18 (0.85-1.63)	0.31	
2	1.26 (0.87-1.80)	0.21	1.30 (0.92-1.84)	0.14	
3	0.63 (0.41-0.97)	0.04	0.67 (0.46-0.96)	0.03	
Leche Madura (n=100)					
	Razón de Peligro		Razón de Peligro		
Factores	(IC 95%)	p	(IC 95%)	p	
1	0.74 (0.45-1.2)	0.22	0.71 (0.44-1.14)	0.15	

2	0.96 (0.65-1.44)	0.86	0.92 (0.62-1.36)	0.67
3	1.24 (0.83-1.84)	0.29	1.24 (0.84-1.82)	0.28

*Siglas(NEC: enterocolitis necrosante)

Tabla 6. Correlación entre los factores y la concentración individual de los oligosacáridos.

Gráfico 1. Composición (%) de oligosacáridos en calostro de madres de niños con muy bajo peso

	Calostro			Leche Madura		
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 1	Factor 2	Factor 3
2'FL	-0.31	-0.15	0.27	-0.24	0.05	-0.32
3'FL	-0.15	0.05	0.22	-0.03	0.14	-0.04
LNnT	0.03	-0.02	-0.16	-0.01	-0.12	0.07
3'SL	-0.06	0.06	-0.03	-0.05	0.16	0.23
DFLac	-0.19	0.30	0.14	-0.04	0.22	0.18
6'SL	0.06	0.01	-0.10	0.04	0.09	-0.04
LNT	0.16	-0.11	0.08	0.05	-0.22	0.08
LNFP I	-0.08	-0.37	0.08	-0.18	-0.13	-0.12
LNFP II	0.21	0.32	0.03	0.18	-0.04	0.17
LNFP III	0.03	-0.04	0.03	0.02	-0.06	-0.01
LSTb	0.05	-0.07	0.03	0.01	-0.09	0.10
LSTc	-0.02	0.01	-0.04	0.05	0.10	-0.08
DFLNT	-0.02	0.09	-0.14	0.04	0.17	0.05
LNH	0.01	0.05	0.06	0.22	0.06	-0.27
DSLNT	0.07	-0.04	-0.11	-0.01	-0.09	0.12
FLNH	0.05	0.09	-0.01	0.09	0.10	-0.04
DFLNH	-0.01	-0.05	0.28	-0.04	-0.06	-0.13
FDSLNH	0.13	-0.08	0.63	0.24	-0.08	-0.24
DSLNH	0.02	0.02	0.05	0.06	0.11	-0.10

Se coloca en negritas las correlaciones mayores a 0.3. En rectángulo la correlación del oligosacárido FDSLNH con el factor 3 de calostro.

al nacer. (n=106)

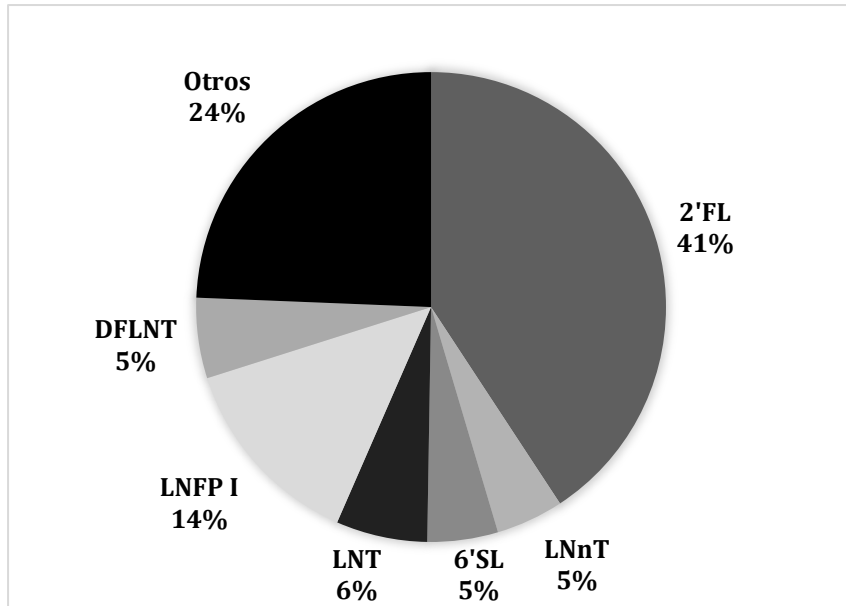


Gráfico 2. Composición (%) de oligosacáridos en leche de madres de niños con muy bajo peso al nacer. (n=102)

