

Oligosacáridos en la leche humana

I. Vitoria Miñana

Sección de Nutrición Infantil. Hospital «Lluís Alcanyis». Xàtiva (Valencia)

Resumen

La leche materna contiene más de 130 oligosacáridos distintos, que constituyen el tercer componente de ésta. Su concentración total disminuye a medida que avanza el curso de lactancia, de modo que al año contiene menos de la mitad que en las primeras semanas de vida. Los oligosacáridos más abundantes en la leche humana son libres (no conjugados) y neutros y contienen fucosa. Los oligosacáridos fucosilados pueden tener un enlace 2-fucosa o 3-fucosa, composición que varía según la procedencia de las madres y el curso de la lactancia. Los oligosacáridos actúan como receptores competitivos sobre la superficie celular del huésped, previniendo así la adherencia de determinados patógenos. La fracción de oligosacáridos no digerida en la leche materna estimula el crecimiento de bifidobacterias en el colon, y esta flora podría tener efectos beneficiosos de protección frente a infecciones entéricas. Así, los oligosacáridos son un componente principal del sistema inmunológico innato por el cual la madre protege a su hijo de patógenos (entéricos o de otra localización) durante la lactancia.

Palabras clave

Oligosacáridos, leche humana, prebiótico, microbiota intestinal

Introducción

Los oligosacáridos (OS) son hidratos de carbono que contienen más de 3 monómeros unidos por enlaces glucosídicos. Aunque habitualmente se consideran OS hasta 30 moléculas de monosacáridos y polisacáridos, a partir de esta cifra la diferencia entre OS y polisacáridos no está estrictamente definida. Los OS están presentes, fundamentalmente, en la leche humana (LH), las frutas, los vegetales y la miel¹. La fuente de los principales tipos de OS se muestra en la tabla 1².

Oligosacáridos presentes en la leche humana

Los OS de la LH son hidratos de carbono que tienen lactosa en el extremo reductor y fucosa o ácido siálico en el extremo no reductor. Aunque pueden contener entre 3 y 32 monómeros, la mayoría de OS de la LH tienen 3-8 moléculas de los siguientes

Abstract

Title: Oligosaccharides in human milk

Human milk contains more than 130 different oligosaccharides. Oligosaccharides are the third constituent of human milk. The total concentration of oligosaccharides decline over the course of lactation, so that the mean concentration after one year is less than half that in the first weeks of life. The most common human milk oligosaccharides are free (non-conjugated), neutral, and containing fucose. Fucosylated oligosaccharides can be 2-linked fucose or 3-linked fucose, and these patterns of milk oligosaccharides vary among individuals and during lactation. Oligosaccharides act as competitive receptors on the host cell surface, thereby preventing adhesion of a number of bacterial and viral pathogens. Part of the undigested oligosaccharides in human milk may contribute to stimulation of the growth of bifidobacteria in the colon, and this flora might have beneficial effects such as some protection against enteric infections. Thus, oligosaccharides are a major constituent of an innate immune system of human milk, whereby the mother protects her infant from enteric and other pathogens through breastfeeding.

Keywords

Oligosaccharides, breastfeeding, prebiotic, intestinal microbiota

monosacáridos: D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc) y ácido siálico (Sial). A partir de la lactosa (extremo reductor) se añaden residuos de Gal con un enlace β -1-6 o residuos GlcNAc unidos en enlace β -1-3 por medio de glucosiltransferasas. Las moléculas se van haciendo más complejas a medida que se añaden residuos de Fuc o lactosamina en diferentes posiciones.

Los OS de la LH pueden estar en forma libre o conjugados. Los OS libres son el tercer componente en importancia de la LH tras la lactosa y los lípidos. Los OS conjugados incluyen glucoproteínas, glucolípidos, glucosaminglicanos y otros. Por otra parte, también se distinguen los OS de la LH en neutros (75-85%) y ácidos.

El contenido de OS libres en la LH madura es de 9-12 g/L, y llegan a ser de 15-23 g/L en el calostro. No hay diferencias significativas en cuanto a la edad gestacional³.

La caracterización bioquímica mediante cromatografía ha permitido aislar alrededor de 130 OS distintos en LH, del tipo

TABLA 1

Tipos de oligosacáridos alimentarios y procedencia de éstos

Tipo de oligosacáridos	Fuente
Fructo-OS (FOS) (levanos e inulina)	Achicoria, cebolla, ajo, alcachofa
Galacto-OS (GOS)	Beta-GOS: leche Alfa-GOS: legumbres
Xilo-OS (XOS)	Frutas, verduras, miel, leche
Isomaltosoligosacáridos (IMOS)	Salsa de soja, sake, miel

galacto-OS (GOS) y fructo-OS (FOS). Sin embargo, con la tecnología basada en la espectrometría de masas MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization)⁴ se distinguen más de 1.200 OS, ya que permite caracterizar los isómeros.

Síntesis de oligosacáridos neutros en la leche humana

Los OS neutros más importantes se forman a partir de la lactosa por medio de glucosiltransferasas (GT), de modo que se forman 3 OS centrales, o *core*: lactosa, lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-neo-tetraosa (LNnT), tal como se observa en la figura 1⁵.

Estas 3 moléculas (lactosa, LNT y LNnT) darán lugar a distintos compuestos por fucosilación mediante la acción de fucosiltransferasas (FUT), de modo que el enlace de fucosa se realiza en la posición alfa 1-2 o en otra posición (sobre todo alfa 1-3).

La adición de fucosa es dependiente de la acción de, al menos, 3 FUT diferentes (figuras 2 y 3):

- FUT-2, enzima controlada por determinantes genéticos del gen *Se* (secretor) presente en la sangre. Da lugar a OS con enlaces alfa 1-2 de fucosa (OS-F2). Los más importantes son:

- LNF-I (lacto N-fuco-pentaosa I) o antígeno H1, que se forma al actuar la FUT-2 sobre LNT.
- 2'-FL (2'-fucosil-lactosa) o antígeno H2, sintetizada al actuar la FUT-2 sobre la LNnT.

La FUT-2 está presente en el 77% de población caucasiana.

- FUT-3. Enzima controlada por determinantes genéticos del gen *Lewis* (Le) de la sangre. Da lugar a OS con enlaces alfa 1-3 de fucosa (OS-F3). Los más importantes son:

- LNF-II (lacto-N-fuco-pentaosa II) o antígeno Lewis a, que se forma al actuar la FUT-3 sobre LNT.
- 3-FL (3-fucosil-lactosa) o antígeno Lewis x, al actuar la FUT-3 sobre la LNnT.

La FUT-3 está presente en el 20% de la población.

Cuando están presentes las enzimas FUT-2 y FUT-3 se puede formar LDFH-I (lacto-N-difucohexaosa), o antígeno Lewis b, y LDFT (lacto-difucosil-tetraosa), o antígeno Lewis y.

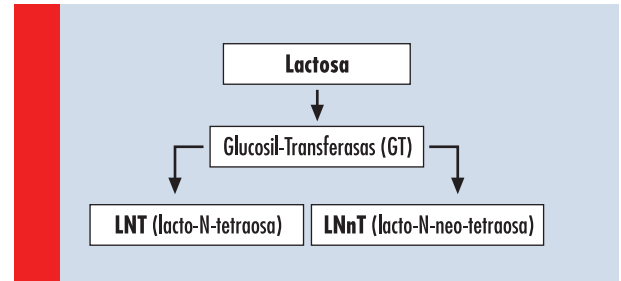


Figura 1. Síntesis de los tres oligosacáridos básicos a partir de la lactosa en la leche humana

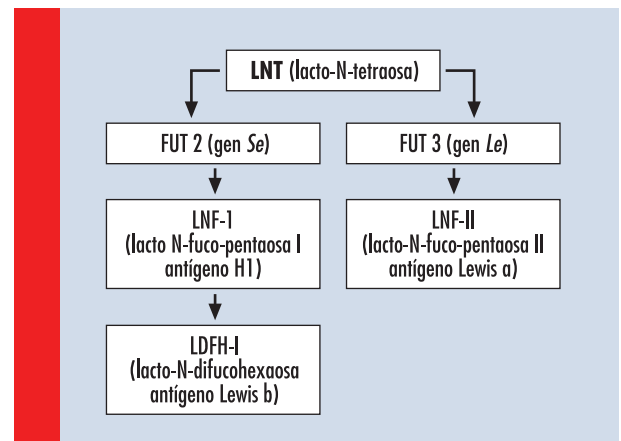


Figura 2. Síntesis de oligosacáridos de la leche humana a partir de lacto-N-tetraosa

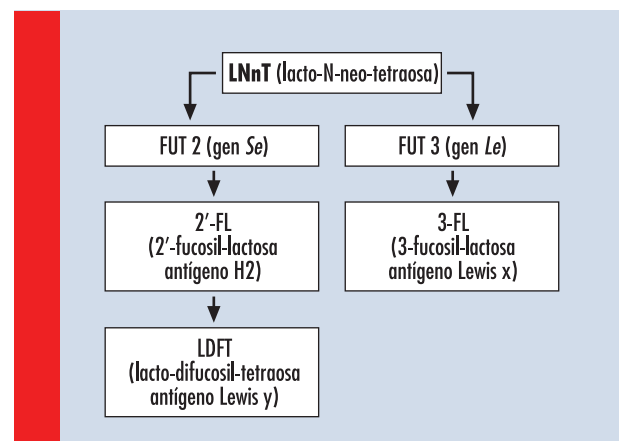


Figura 3. Síntesis de oligosacáridos de la leche humana a partir de lacto-N-neo-tetraosa

- En un 5% de la población se puede formar LNF-III (lacto-N-fucopentaosa III), o gen *Lewis* x, y otros compuestos en los que las enzimas implicadas son FUT-4, FUT-5, FUT-6, FUT-9, etc., determinadas genéticamente por otra familia distinta del gen *Se* y del gen *Lewis*.

Además de las FUT, varias sialiltransferasas pueden añadir NeuAc en diferentes posiciones de los OS, dando lugar a la formación de muchos más tipos de OS en la LH.

En resumen, se forman básicamente 2 tipos de fucosil-OS (tabla 2):

- OS con enlaces alfa 1-2: LNF-I y 2'-FL.
- OS con enlaces no alfa 1-2 o alfa 1-3,4: LNF-II y 3-FL.

Estas dos enzimas, FUT-2 y FUT-3, compiten por el mismo sustrato, lo que explica el recíproco control de la expresión de estas 2 clases de OS.

Las enzimas FUT presentes en las células acinares mamarias catalizan la síntesis de los determinantes genéticos de los eritrocitos que se incluyen en la clasificación de los grupos sanguíneos H-1, H-2, Le a, Le b, Le x y Le y. Estos determinantes forman parte de los glucolípidos de los receptores de la superficie celular eritrocitaria. La variabilidad poblacional observada se debe a que la distribución de los genes *Se* y *Lewis* no es uniforme en la población mundial debido al polimorfismo genético.

Distribución de oligosacáridos en la leche humana según la edad⁶

La concentración total de OS disminuye a medida que avanza la lactancia: al año es aproximadamente la mitad que la de los primeros días de vida.

En cuanto al tipo de OS, en la mayoría de los casos hay un predominio de OS-2 que van disminuyendo con la edad. La *ratio* entre OS-2 y OS-3 también disminuye con la edad, pasando de 5 en el primer mes a 0,5 hacia los 8 meses. De los OS-2 fucosilados, el más abundante es 2'FL, y de los OS no fucosilados en posición 2, el predominante es LNF-II. A medida que pasan las semanas de lactancia, aumenta el porcentaje de OS-3.

En los casos en que hay un predominio de OS-3 u OS-4, va aumentando la fracción de OS-2 a partir de los 6 meses de lactancia materna, y en este caso también aumenta la *ratio* con la edad.

Distribución de los oligosacáridos según la procedencia materna^{7,8}

Según un estudio de OS en LH de 435 madres residentes en 10 países distintos, se comprobó que todas las muestras contienen lactosa, LNT y LNnT (cabezas de series de síntesis) y que hay una variabilidad en la composición según las áreas de pro-

cedencia, que probablemente se relacione con la distribución de los determinantes genéticos *Se* y *Le*. El mayor componente de OS-2 de la LH, el 2'FSL, está presente en el 100% de las mujeres mexicanas, el 91% de las francesas, 83% de las alemanas, el 86% de las italianas y el 46% de las filipinas. También en este estudio, 2'FL disminuye con las semanas de lactancia, mientras 3'FL aumenta.

El motivo por el que disminuye la concentración en OS a medida que aumenta el tiempo de lactancia no está claro. En algunos trabajos se decía que bajan las concentraciones de OS porque aumentan las de lactosa⁹. Sin embargo, en el reciente trabajo de Saarela et al.¹⁰ se comprueba que la lactosa no sufre casi cambios con el periodo de lactancia.

Ha recibido también mucho interés la composición de OS en el calostro. Así, tanto en el calostro de los primeros 3 días de madres de Burkina-Faso como de Italia hay un predominio de OS-2¹¹, pero en las primeras hay una mayor concentración de 2'FL que de LNF-I, mientras que en el calostro de madres italianas hay mayor LNF-I y posteriormente aumenta el 2'FL. Los autores creen que este distinto perfil de OS puede presentar diferencias biológicas y podría deberse a las distintas condiciones ambientales a que se van a someter estos niños al nacer. En este mismo sentido, en un estudio realizado con calostro de madres japonesas¹² también se demostraba que el OS-2 predominante era el LNF-I y después el 2'FL, al igual que en las madres italianas.

Efectos de los oligosacáridos de la leche humana

Los dos principales efectos demostrados de los OS de la LH son el antinfecioso y el bifidogénico:

Efecto antinfecioso

En estudios *in vitro* se ha demostrado que los OS de la LH tienen una estructura semejante a la de los receptores específicos hidrocarbonados de bacterias, toxinas y virus, de modo que actúan como receptores competitivos en las células intestinales de superficie del huésped, previniendo la adhesión de patógenos¹³. Además, hay glucoproteínas y glucolípidos en la estructura de membrana de las células de mamíferos que pueden enlazarse a mediadores humorales y participar en la información transmembrana¹⁴.

Se ha demostrado que los OS-2 fucosa (determinados por el gen *Se*) inhiben el enlace con ligandos de células del huésped con:

- *Campylobacter jejuni* (inhibe la adherencia a las células epiteliales)¹⁵.
- Calicivirus¹⁶.
- Enterotoxina ST de *Escherichia coli*¹⁷.
- *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* en células epiteliales faríngeas y bucales⁴.
- *Helicobacter pilory*¹⁸.

TABLA 2

Oligosacáridos principales en la leche humana y tipo de enlace fucosilado predominante

Gen	Enzima	Enlace	OS principales
Se	FUT-2	Alfa 1-2	LNF-I 2'FL
Le	FUT-3	Alfa 1-3	LNF-II 3-FL

En un estudio de cohortes¹⁹, realizado en 93 niños mexicanos que tomaron lactancia materna hasta los 9 meses de media, se calculó la incidencia de diarreas hasta los 2 años y se comparó con el contenido en OS de la LH. A las 1-5 semanas de vida, el 75% de los OS fucosilados en LH son OS-2 fucosilados –LNF-I (25%), 2'FL (35%), LDFH-I (10%) y LDFT (5%)– y hay una relación entre la incidencia de gastroenteritis por *Campylobacter* y la baja concentración de 2'FL, la incidencia de calicivirus y baja concentración de LDFH-I, así como el total de diarreas moderadas o severas y la baja concentración de OS-2.

En otra publicación de este trabajo⁵ también se demuestra que cuanto mayor es la relación entre OS-2 fucosilados y los restantes OS, menor es el riesgo de diarrea por *E. coli* y el porcentaje de diarrea moderada y severa.

Por tanto, si los OS-2 son protectores frente a determinados gérmenes causantes de diarreas y el genotipo secretor (Se o Le a-b) tiene mayor *ratio* OS2/OS-3, cabría preguntarse si el grupo ABO de la madre se relaciona con el genotipo Le, y éste con el fenotipo de síntesis de OS-2 fucosilados. Sin embargo, la respuesta no es tan fácil, pues el fenotipo del grupo sanguíneo materno no explica completamente la expresión fenotípica de los OS-2 debido al amplio polimorfismo genético. La correlación exacta se haría con la genotipificación de las enzimas FUT presentes en las células acinares de la glándula mamaria materna.

Además de estos gérmenes, hay otros en los que también intervienen los OS:

- OS que inhiben la adhesión de *E. coli* a las células del epitelio vesical²⁰.
- La infección por rotavirus se inhibe por OS *in vitro* de la LH, pero no fucosilados sino conjugados con proteínas (lactadherina).
- La inhibición de la adhesión a las células CACO-2 es distinta según el tipo de OS y el tipo de germen²¹.

Si los OS-2 son importantes para la prevención de infecciones entéricas y hay variaciones individuales en la composición de la LH según las distintas áreas geográficas, cabe preguntarse, como hacen Uauy et al.²², si ha habido una adaptación genética a los receptores que convenía inhibir, actuando la adaptación a las infecciones como una fuerza selectiva de la evolución humana, y si la disminución de la *ratio* OS-2:OS-3 de 5:1 a 1:1 durante el primer año de vida se produce sólo porque el riesgo es menor o por otra circunstancia. Además, el hecho de que con la tecnología MALDI se aislen más de 1.000 OS, ¿indica que hay una gran variedad de receptores bacterianos de superficie celular?

En otro orden de cosas, Newburg et al.¹³ hacen otra reflexión interesante. El mecanismo de inhibición de los antibióticos se basa en un proceso de inhibición metabólica de procesos distintos a los de los mamíferos, de modo que las propias bacterias han realizado mutaciones que les permiten sobrevivir haciéndose cepas resistentes. Sin embargo, la inhibición de los

OS de la LH ha sido milenaria y no ha formado resistencias porque actúa sobre la células del huésped colocando estructuras semejantes a las de las propias bacterias en la superficie de nuestras propias células. Es decir, el mecanismo sería algo así como «espíar al enemigo» para fabricar precisamente unos receptores muy parecidos a los que la bacteria piensa emplear, a diferencia de la acción del antibiótico que «penetra en el enemigo» y trata de bloquearlo o inactivarlo, y es ahí precisamente donde la bacteria se aprovecha y crea su mecanismo de adaptación o resistencia.

Efecto bifidogénico

Los factores de la LH que favorecen el predominio de la flora bifidógena son múltiples: lactoferrina, nucleótidos, una menor concentración de proteínas y de fósforo, así como los propios OS. Los OS de la LH son bifidógenos debido a que sirven como sustrato alimentario de las bifidobacterias (BFD) y lactobacilos (LB), fundamentalmente. Además, los OS-acetilglicosaminas son un componente de la pared celular de las BFD.

Según el concepto clásico de Gibson y Roberfroid²³, para considerar una sustancia como prebiótico se le exige que no sea digestible, de modo que llegue al colon, que sea un sustrato de la flora microbiana y fomente el crecimiento de BF y LB, y que reduzca el crecimiento de bacterias patógenas²⁴. En este sentido, los OS de la LH son resistentes a la digestión enzimática, alcanzando el colon. Se eliminan por orina en un 1% (se absorberían un 10%) y se eliminan por heces 10 veces más, debido a que hay glicanos que se producen por digestión de polisacáridos parcialmente absorbidos²⁵. También con la mezcla de FOS/GOS administrada en las fórmulas suplementadas se comprueba que los OS son detectables en las heces²⁶.

Las principales acciones beneficiosas derivadas de la presencia de una flora con predominio de BFD, como consecuencia de los OS, son las siguientes^{27,28}:

- Metabólica. Fermentación de los OS con formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como propiónico, butírico y acético.
- Nutricional. El género BFD favorece la síntesis de vitaminas B₆ y B₁₂, tiamina, ácido fólico y ácido nicotínico, aunque no se sabe el grado de aprovechamiento de estas vitaminas. Asimismo, los AGCC en el ciego favorecen la absorción de calcio, hierro y cinc, debido a que el bajo pH produce un aumento de solubilidad y una mayor absorción por difusión pasiva.
- Trófica. El butirato supone una importante fuente energética (60-70%) del colonocito. Además, los 3 AGCC favorecen el crecimiento y la diferenciación de células epiteliales *in vivo*.
- Protectora e inmunomoduladora. La barrera intestinal inmadura puede favorecer una transferencia aumentada de antígenos, lo que produce inflamación y el consiguiente aumento de permeabilidad y riesgo de enfermedad alérgica. En algunos estudios clínicos se ha demostrado que la flora mi-

crobiana con mayor porcentaje de BFD se asociaba con una menor prevalencia de atopia²⁹.

Finalmente, hay otros efectos de los OS de la LH. Tal vez en los próximos años se pueda aportar más información sobre el efecto inmunomodulador (por alteración de las interacciones sistémicas proteína-hidratos de carbono, de modo que se inhibiría la formación de los complejos plaquetas-neutrófilos y la misma activación leucocitaria) y el efecto modificador de los epítopes de los glicanos de las células epiteliales intestinales (por alteración de la expresión de glucosiltransferasas)³⁰.

Bibliografía

- Boehm G, Stahl B, Jelinek J, Knol J, Miniello V, Moro GE. Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatr.* 2005; 94 Supl 449: 18-21.
- Escudero E, González Sánchez P. La fibra dietética. *Nutr Hosp.* 2006; 21 Supl 2: 61-72.
- Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects *Annu Rev Nutr.* 2000; 20: 699-722.
- Stahl B, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F, Steup M, et al. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1994; 223: 218-226.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero Mde L, et al. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology.* 2004; 14: 253-263.
- Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, et al. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology.* 2001; 11: 365-72.
- Erney RM, Malone WT, Skelding MB, Marcon AA, Kleman-Leyer KM, O'Ryan ML, et al. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30: 181-192.
- Newburg DS. Are all human milks created equal? Variation in human milk oligosaccharides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30: 131-133.
- Coppa GV, 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.
- Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatr.* 2005; 94: 1.176-1.181.
- Musumeci M, Sempore J, D'Agata A, Sotgiu S, Musumeci S. Oligosaccharides in colostrum of Italian and Burkinabe women. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 43: 372-378.
- Sumiyoshi W, Urashima T, Nakamura T, Arai I, Saito T, Tsumura N, et al. Determination of each neutral oligosaccharide in the milk of Japanese women during the course of lactation. *Br J Nutr.* 2003; 89: 61-69.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr.* 2005; 25: 37-58.
- Newburg DS. Innate immunity and human milk. *J Nutr.* 2005; 135: 1.308-1.312.
- Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem.* 2003; 278: 14.112-14.120.
- Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacios G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology.* 2002; 122: 1.967-1.977.
- Martin-Sosa S, Martin MJ, 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: 3.067-3.072.
- Newburg DS. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr Med Chem.* 1999; 6: 117-127.
- Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinzen-Derr JK, et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr.* 2004; 145: 297-303.
- Coppa GV, Gabrielli O, Giorgi P, Catassi C, Montanari MP, Varaldo PE, et al. Preliminary study of breastfeeding and bacterial adhesion to uroepithelial cells. *Lancet.* 1990; 335: 569-571.
- Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, Capretti R, et al. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatr Res.* 2006; 59: 377-382.
- Uauy R, Araya M. Novel oligosaccharides in human milk: understanding mechanisms may lead to better prevention of enteric and other infections. *J Pediatr.* 2004; 145: 283-285.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995; 125: 1.401-1.412.
- Knol J, Boehm G, Lidestri M, Negretti F, Jelinek J, Agosti M, et al. Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed preterm infants. *Acta Paediatr.* 2005; 94 Supl: 31-33.
- Chaturvedi P, Warren CD, Buescher CR, Pickering LK, Newburg DS. Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 501: 315-323.
- Moro GE, Stahl B, Fanaro S, Jelinek J, Boehm G, Coppa GV. Dietary prebiotic oligosaccharides are detectable in the faeces of formula-fed infants. *Acta Paediatr.* 2005; 94 Supl: 27-30.
- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003; 361: 512-519.
- Sanz Y, Collado MC, Haros M, Dalmau J. Funciones metabólicas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: prebióticos y probióticos. *Acta Paediatr Esp.* 2004; 62: 520-526.
- Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: 516-520.
- Bode L. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J Nutr.* 2006; 136: 2.127-2.130.