

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA, SALUT  
PÚBLICA, CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ, TOXICOLOGIA  
I MEDICINA LEGAL

EVALUACIÓN DE ÁCIDOS SIÁLICO Y GANGLIÓSIDOS EN  
LECHE Y PREPARADOS INFANTILES.

RAMÓN LACOMBA PERALES

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 2 de juny de 2011 davant un tribunal format per:

- Dra. Reyes Barberá Sáez
- Dra. Rosaura Farré Rovira
- Dr. Gaspar Ros Berruezo
- Dr. Fernando Sánchez Juanes
- Dr. Gonzalo Clemente Marín

Va ser dirigida per:

Dra. María Jesús Lagarda Blanch

Dra. Amparo Alegría Torán

Dr. Pablo Hueso Pérez

©Copyright: Servei de Publicacions  
Ramón Lacomba Perales

---

I.S.B.N.: 978-84-370-8223-3

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Arts Gràfiques, 13 baix  
46010 València  
Spain  
Telèfon:(0034)963864115



## **Facultat de Farmàcia**

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de  
l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal

- Àrea de Nutrició i Bromatologia -

### **EVALUACIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO Y GANGLIÓSIDOS EN LECHE Y PREPARADOS INFANTILES**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Ramón Lacomba Perales**

Dirigida por:

**Dra. Amparo Alegría Torán**

**Dra. M<sup>a</sup> Jesús Lagarda Blanch**

**Dr. Pablo Hueso Pérez**

Valencia, Diciembre de 2010



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**Facultat de Farmàcia**

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,  
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal  
Àrea de Nutrició i Bromatologia



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**Facultad de Biología**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

AMPARO ALEGRÍA TORÁN y MARÍA JESÚS LAGARDA BLANCH, profesoras titulares del Área de Nutrición y Bromatología en el Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal, de la Universitat de València y PABLO HUESO PÉREZ, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN QUE:

El licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos D. RAMÓN LACOMBA PERALES ha realizado bajo su dirección un trabajo que lleva por título **“Evaluación de ácido siálico y gangliósidos en leche y preparados infantiles”** y, autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que conste a los efectos oportunos,

En Burjassot, a 13 de diciembre de 2010.

Fdo: Amparo Alegría Torán

Fdo: María Jesús Lagarda Blanch

En Salamanca, a 10 de diciembre de 2010

Fdo: Pablo Hueso Pérez

Este trabajo forma parte del Contrato de Investigación 98/2007 entre la Universitat de València y Hero España S.A., para el “Estudio de componentes bioactivos presentes en leche y productos destinados a la alimentación del lactante”.

Una parte del trabajo ha sido financiada con el proyecto Consolider-Ingenio 2010 CSD2007-00063 (Fun-C-Food).

El doctorando Ramón Lacomba Perales ha disfrutado de un Beca V Segles-Empresa de la Universitat de València en colaboración con Hero España S.A.

Grupo de investigación Bionutest (03/003).

*Quiero dedicar este trabajo a mis padres  
y familia (especialmente a mi abuelo Lorenzo)*

*Y sobre todo a Paula e Irene*

*Una vez leí a Ángela Becerro decir que “la razón es el antídoto del desconocimiento, y que ésta es concreción y se sustenta en las evidencias, mientras que la fe es ilusión y se sustenta en el deseo”. En este trabajo se entremezclan ambas.*

Sinceramente me hubiese gustado saltarme los agradecimientos, ya que soy de lágrima fácil, y con la dedicatoria ya he tenido que tragar saliva, pero cuando concluyes algo así, sin duda lo has conseguido gracias a la ayuda y apoyo de mucha gente. Así que allá voy:

Quiero dar las gracias a mis directoras las Dras. Amparo Alegría y María Jesús Lagarda, así como a mi directora “en la sombra”, Reyes Barberá por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral junto a vosotras y por haberme formado como investigador. En particular, muchas gracias Amparo por haberme transmitido el rigor científico, muchas gracias María Jesús por inculcarme paciencia y crear siempre un ambiente tranquilo y relajado, muchas gracias Reyes por ser el acicate necesario para no perder la tensión. Durante este arduo trabajo habéis sido un apoyo, una guía y una referencia constante, tanto en lo científico como en lo personal, a costa de algún que otro dolor de cabeza y estado de afonía que os haya podido causar. Sin duda constituís un gran equipo, a parte de la telepatía que habéis desarrollado a lo largo del tiempo, porque cada una tiene una cualidad que complementa a las otras.

Gracias a mi otro director, el Dr. Pablo Hueso, que indudablemente es un referente mundial en el estudio del ácido siálico y los gangliósidos, y por tanto una pieza clave en la elaboración de esta tesis. Muchas gracias Pablo por todos los conocimientos que me has transmitido, así como por el trato personal que me has dispensado durante mis múltiples estancias en tu laboratorio, tu ciudad y tu casa. Un millón de gracias por enseñarme cosas sobre el “sialismo”, el jazz, Salamanca y el “Le Mans”.

Gracias a la Dra. Rosaura Farré, por acogerme de una forma tan grata en su grupo. A partir de ese momento comenzó mi carrera investigadora. Muchas gracias Rosaura por su constante interés y apoyo sobre el trabajo que he realizado.

Gracias a las Dras. Ana Frígola y María José Esteve, por amenizar el día a día en el laboratorio, y por la ayuda que me habéis prestado siempre que ha sido necesario.

Gracias a toda la gente de nuestro laboratorio gemelo (nutri-toxi), tanto a profesores como becarios, así como al personal técnico y administrativo del departamento, por amenizar y facilitarme el trabajo diario.

Gracias a Hero por la financiación y las muestras.

Gracias a Jaime, sin duda “mi amigo más compañero y mi compañero más amigo” como bien dices tú. Muchas gracias por estar siempre ahí, ayudándome en todo incluso antes de que te lo pidiese. Hemos recorrido juntos este camino desde el principio, desde el primer día que pisé la universidad (hace 11 años ya!!!), y espero que tomemos el camino que tomemos sigamos siendo tan buenos compañeros y/o amigos. Por cierto siento haberte metido en este mundo del sialismo, que tanto te maltrata el sistema digestivo.

Gracias a Toni, mi “brother in lab”, la primera persona con la que hablé nada más entrar en el laboratorio y que con sus palabras me convenció para que comenzara la tesis. Muchas gracias por tener una sonrisa siempre preparada, por estar siempre dispuesto a ayudar y por iniciarme en el levantínismo. Cuando empezamos quedábamos Amparito, Paula, tú y yo, y ahora somos 6 y dentro de poco 7... hay que ver que mayores somos. Por cierto, en este punto también quiero darle las gracias a Pablo por cedernos parte de su comida, y Amparo, sin tu leche este trabajo hubiese quedado cojo.

Gracias a Moisés, nuestro hermano mayor, el que nos acogió a todos y nos fue enseñando todo lo que sabía, que era mucho, y que todavía sigue enseñándonos cosas. Espero que dentro de unos años cuando dirijas un grupo te acuerdes de tus “chavales”. Como ya te dijo Toni, “yo de mayor quiero ser como tú”.

Gracias a Francisco, por la ayuda que me has prestado siempre que lo he necesitado y por ser un contertulio tan apasionado, hay que ver cuantas horas hemos estado hablando de lo mismo y no hemos podido arreglar el mundo.

Gracias a Laia, Marina, M<sup>a</sup>José y M<sup>a</sup>Carmen, por compartir los buenos y malos momentos que se viven en el laboratorio y ayudarme en estos últimos años. Muchas gracias a Lupe, quién nos iba a decir ese día que me diste prácticas, que durante este tiempo íbamos a compartir tan buenos momentos, incluyendo nuestro encuentro con Pepe, que tanto te cambió la vida. También muchas gracias a toda la gente que ha ido pasando por aquí y

con quienes también he compartido muy buenos momentos (Vicente, Saraí, María, Rebeca, Jessica, Celia, Lourdes, Ana, Clara, Sara, Giada, ...).

Gracias a toda la gente de Salamanca: Jose Luís, Guillermo, Nacho, Javi, Lorena, Jose, Marcial y Enrique. Y especialmente muchas gracias a Fer y María por acogerme como un hermano, enseñarme todo sobre los gangliósidos y descubrirme Salamanca. Nunca olvidaré todo lo que ganamos estando juntos, cada vez que un blaugrana levante una copa tendrás un mensaje mío!!!

Gracias a Iván, por compartir tantos y tantos buenos y malos momentos juntos, por ser mi vía de escape de esto de la tesis, por aguantar todos los rollos científicos que te he contado, por aguantar estoicamente el 2-6 y el 5-0 hasta el final del partido, por las horas echadas al Wining y el COD. Y como no, un millón de gracias por presentarme a Paula.

Gracias a Vicente, Lourdes, Héctor, Noelia y Pedro, por mantener viva la amistad que surgió de los “alimentos”. Espero que sigamos quedando durante muchos años. Por cierto Vicente, esto que has empezado es muy duro, pero cuando dentro de unos años estés escribiendo los agradecimientos de tu tesis verás como merece la pena.

Gracias a todas mis tías, tíos y primos, porque gracias a vosotros soy como soy. Quiero dar las gracias especialmente a mi abuela Josefa y mi abuelo Lorenzo por criarme desde que era un bebé. Sin duda una parte fundamental de mi forma de ser os la debo a vosotros, y el gusanillo del estudio me vino de ti, abuelo. Si estuvieses aquí recordaríamos ese primer día que me llevaste a la guardería, y lloré tanto, y tú pacientemente te

quedaste fuera todo el día para que pudiese verte desde la ventana, porque esa fue la primera piedra para edificar este trabajo. Espero que estés donde estés puedas ver la culminación de lo que hiciste conmigo y te sientas orgulloso.

Gracias a mis padres, porque sin vuestros sacrificios constantes no sería nadie, me habéis dado todo sin esperar nada a cambio y a pesar del tiempo me lo seguís dando todo. Gracias por vuestra ayuda y amor incondicional y por cuidar de Irene. Y gracias a mi hermano, con quien tanto he compartido. Espero que ver esto te dé el empujoncito necesario para acabar tu tesis.

Gracias a mis suegros, cuñadas y resto de familia política por acogerme como a uno más.

Y por último, por ser la persona más importante en mi vida, muchas gracias Paula por darle cuerda a mi mundo todos los días. Ya sabes que “desde el día en que te conocí, me enamoré de ti, en ti vi todo lo que siempre imaginé”. A lo largo de estos extensos agradecimientos se puede ver como hay mucha gente que ha sido fundamental para que consiguiese escribir la tesis, pero sin ti seguro que no hubiese podido hacerlo, porque has sido mi apoyo constante, de hecho ahora mismo sin ti no creo que pudiese hacer nada. Un millón de gracias por aguantarme durante estos años, por tirar de mí para que vaya madurando, por ser como eres, pero sobre todo por Irene, cuya sonrisa ilumina nuestro mundo.

xB xtlvd

# **ÍNDICES**

	<b>Página</b>
<b>Índice de cuadros</b>	XVII
<b>Índice de figuras</b>	XXI
<b>ABREVIATURAS</b>	XXVI
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETO Y PLAN DE TRABAJO</b>	4
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	7
1. Alimentación del lactante	8
1.1 Leche humana	8
1.2 Alimentación artificial	14
1.2.1 Tipos de preparados infantiles	15
1.2.2 Composición de preparados para lactantes y de continuación	18
1.2.3 Elaboración de preparados infantiles	21
2. Ácido siálico	25
2.1 Estructura	25
2.2 Presencia y distribución en organismos vivos	28
2.3 Funciones	32
2.4 Métodos de determinación en muestras biológicas y productos lácteos	35
2.5 Contenidos en leche y preparados infantiles	48

	<b>Página</b>
3. Gangliósidos	55
3.1 Estructura y nomenclatura	55
3.2 Presencia y distribución en organismos vivos	59
3.3 Funciones	62
3.4 Métodos de determinación en muestras biológicas y productos lácteos	65
3.5 Contenidos en leche y preparados infantiles	75
4. <i>Biodisponibilidad</i>	83
4.1 Definiciones	83
4.2 Biodisponibilidad de ácido siálico y gangliósidos	88
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	94
1. Descripción de muestras	95
<b>METODOLOGÍA</b>	100
2. Determinación de ácido siálico	101
2.1 Hidrólisis	101
2.2 Purificación	101
2.3 Determinación por espectrofotometría	102
2.4 Determinación por HPLC	103

	<b>Página</b>
3. Determinación de gangliósidos	105
3.1 Extracción	106
3.1.1 Extracción de la fracción grasa	106
3.1.2 Partición de Folch	110
3.2 Purificación	110
3.2.1 Diálisis	110
3.2.2 Cromatografía en DEAE-Sephadex	111
3.2.3 Extracción en fase sólida con cartuchos Sep-Pack C18	111
3.3 Determinación del contenido total	112
3.4 Determinación del perfil individual	112
3.5 Pruebas de confirmación	113
3.5.1 Identificación de gangliósidos <i>O</i> -acetilados	113
3.5.2 Identificación de fosfolípidos	113
3.5.3 Inmunoensayos	114
4. Ensayos de <i>biodisponibilidad in vitro</i>	115
4.1 <i>Bioaccesibilidad</i>	115
4.1.1 Etapa gástrica	115
4.1.2 Etapa intestinal	115

	<b>Página</b>
4.2 Ensayos preliminares de <i>biodisponibilidad in vitro</i> (células Caco-2)	117
4.2.1 Determinación de ácido siálico en células Caco-2	118
4.2.2 Determinación del contenido y perfil de gangliósidos en células Caco-2	119
4.2.3 Localización de gangliósidos en células Caco-2	119
4.2.4 Efecto de los gangliósidos sobre la viabilidad de células Caco-2	120
5. Tratamiento estadístico	122
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>123</b>
1. Optimización de la determinación de ácido siálico	124
1.1 Ensayos preliminares con disoluciones patrón	124
1.2 Ensayos preliminares con muestras	126
1.2.1 Selección de la resina de intercambio aniónico	126
1.2.2 Estudio de compuestos interferentes	129
1.2.3 Optimización del tamaño de muestra	133
1.3 Validación del método propuesto	135
2. Ácido siálico	139
2.1 Sueros lácteos	140
2.2 Preparados para lactantes	141

	<b>Página</b>
2.3 Preparados de continuación	145
2.4 Preparados especiales para lactantes	146
2.5 Leche humana	148
3. Ingestas de ácido siálico	150
4. Gangliósidos	154
4.1 Contenido total	154
4.2 Identificación y porcentajes relativos	158
5. Ingestas de gangliósidos	177
6. Ensayos de <i>biodisponibilidad in vitro</i>	179
6.1 <i>Bioaccesibilidad</i>	179
6.1.1 Ácido siálico	179
6.1.2 Gangliósidos	183
6.2 Ensayos preliminares de <i>biodisponibilidad in vitro</i> (células Caco-2)	197
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>207</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>210</b>

	<b>Página</b>
<b>ANEXOS</b>	245
I. Composición de los preparados para lactantes y de continuación (RD 867/2008, ESPGHAN 1990 y 2005)	246
II. Reactivos	249
III. Disoluciones	251
IV. Material	252
V. Instrumentación	253

## Índice de cuadros

<b>Cuadro n°</b>		<b>Página</b>
1	Nombre completo y abreviatura de los ácidos siálicos conocidos hasta 2002 (Angata y Varki, 2002)	27-28
2	Ácido siálico en muestras biológicas o productos lácteos: determinación espectrofotométrica	43-44
3	Ácido siálico en muestras biológicas o productos lácteos: determinación HPLC	45-46
4	Ácido siálico en muestras biológicas o productos lácteos: determinación por HPLC-MS	47
5	Contenidos (expresados como mg Neu5Ac/L) de ácido siálico total, siálico unido a proteínas y glúcidos en leche humana	49
6	Contenidos (expresados como mg Neu5Ac/L) de ácido siálico total, siálico unido a proteínas y glúcidos en leche de otros mamíferos	51
7	Contenidos (expresados como mg Neu5Ac/L) de ácido siálico total, siálico unido a proteínas y glúcidos en preparados para lactantes (PL) y de continuación (PC)	52
8	Nomenclatura y estructura de algunos gangliósidos	58-59
9	Distribución y concentraciones de los gangliósidos en el ser humano	59
10	Métodos de extracción, aislamiento y purificación de gangliósidos en tejidos y fluidos animales y en leche y derivados	68-69

<b>Cuadro n°</b>		<b>Página</b>
11	Contenidos de gangliósidos totales (GG <sub>T</sub> ), expresados en mg ASUL/L y porcentajes relativos de gangliósidos individuales (GG <sub>I</sub> ) en leche humana	76
12	Contenidos de gangliósidos totales (GG <sub>T</sub> ), expresados en mg ASUL/L y porcentajes relativos de gangliósidos individuales (GG <sub>I</sub> ) en leche de otros mamíferos	77-78
13	Contenidos de gangliósidos totales (GG <sub>T</sub> ), expresados en mg ASUL/L y porcentajes relativos de gangliósidos individuales (GG <sub>I</sub> ) en preparados para lactantes (PL) y de continuación (PC)	80
14	Muestras analizadas. Energía y macronutrientes (datos del etiquetado)	96
15	Muestras analizadas. Ingredientes y formato	97-99
16	Linealidad de los métodos espectrofotométrico y HPLC	125
17	Precisión, con disoluciones patrón, de los métodos espectrofotométrico y HPLC	125
18	Purificación de ácido siálico mediante resina Marathon A2. Ensayos de precisión.	127
19	Purificación de ácido siálico mediante resina Dowex 1x8. Ensayos de precisión.	128
20	Purificación de ácido siálico mediante resinas Marathon A2 y Dowex 1x8. Ensayos de recuperación	129
21	Optimización de la cantidad de muestra para la determinación de ácido siálico con la resina Dowex 1x8	135

<b>Cuadro n°</b>		<b>Página</b>
22	Determinación de ácido siálico. Comparación de métodos: límites de detección y cuantificación	136
23	Determinación de ácido siálico. Comparación de métodos: precisión	137
24	Determinación de ácido siálico. Comparación de métodos: ensayos de recuperación	138
25	Sueros lácteos. Contenidos de ácido siálico (mg/100g)	140
26	Preparados infantiles. Contenidos de ácido siálico	144
27	Preparados especiales. Contenidos de ácido siálico	147
28	Ingesta diaria de preparados para lactantes y preparados especiales para lactantes indicadas por el fabricante en función de la edad y el peso	151
29	Contenido total de gangliósidos de las muestras analizadas	154-155
30	Preparados para lactantes. Porcentajes relativos de gangliósidos	163
31	Preparados de continuación. Porcentajes relativos de gangliósidos	168
32	Sueros lácteos. Porcentajes relativos de gangliósidos	173
33	<i>Bioaccesibilidad</i> . Contenidos de ácido siálico (mg/L) en las muestras Ac1, Ac2 y LH sin digerir (SD) y sus respectivos digeridos gástricos (DG) y fracciones <i>bioaccesibles</i> (FB)	180

<b>Cuadro n°</b>		<b>Página</b>
34	Ensayos preliminares. Contenido de gangliósidos (mg ASUL/L) en las muestras Ac1 y Ac2 sin digerir (SD) y sus respectivos digeridos gástricos (DG) y fracciones <i>bioaccesibles</i> (FB)	185
35	<i>Bioaccesibilidad</i> . Contenidos y porcentajes relativos de gangliósidos en Ac1 y Ac2 sin digerir (SD), digerido gástrico (DG) y fracciones <i>bioaccesibles</i> (FB)	191
36	<i>Bioaccesibilidad</i> . Contenido y porcentaje relativo de gangliósidos en LH sin digerir (SD), digerido gástrico (DG) y fracciones bioaccesibles (FB)	192
37	Contenido de ácido siálico y gangliósidos totales en células Caco-2 no diferenciadas y diferenciadas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	197
38	Contenidos y porcentaje relativo gangliósidos en células Caco-2 no diferenciadas y diferenciadas	201

## Índice de figuras

Figura nº		Página
1	Algoritmo para la utilización de preparados infantiles (García-Onieva, 2007)	18
2	Esquema general de la elaboración de preparados infantiles en polvo	22
3	Estructura básica y sustituciones del ácido siálico	26
4	Esquema de la ruta de biosíntesis de ácido siálico (Martínez y Suárez, 2010)	30
5	Reacción de una cetosa con resorcinol (Seliwanoff, 1887)	38
6	Series de glicoesfingolípidos en función de su cadena glucídica	56
7	Estructura del gangliósido GM <sub>3</sub>	56
8	Síntesis de gangliósidos de la serie a y b (Echten-Deckert y Hergert, 2006)	60
9	Esquema de la síntesis de los gangliósidos de las series 0, a, b y c (Tettamanti, 2004)	62
10	Determinación de ácido siálico	104
11	Determinación general de gangliósidos	105
12	Determinación de gangliósidos: extracción de la fracción grasa	107-108
13	Determinación de gangliósidos: partición de Folch	109
14	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	116

<b>Figura nº</b>		<b>Página</b>
15	(a) Espectro de masas del patrón Neu5Ac de 100 ng, (b) espectro de masas del PL Ab1	131
16	Determinación de ácido siálico por espectrofotometría. Ensayo de interferencias de matriz	132
17	Optimización de la cantidad de muestra para la determinación de ácido siálico con la resina Dowex 1x8	134
18	Cromatogramas de: a) Patrón Neu5Ac (150 ng), b) Patrón Neu5Gc (5 ng) y c) PL Ab1	139
19	Ingestas diarias de ácido siálico a partir de preparados infantiles: a) preparados para lactantes, b) preparados especiales para lactantes de en leche humana vs. preparados para lactantes	152
20	Preparados para lactantes. Identificación de gangliósidos por HPTLC	159
21	Preparados para lactantes. Prueba de confirmación de la presencia de <i>O</i> -acetil-GD <sub>3</sub>	161
22	Preparados para lactantes. Confirmación de la presencia de fosfolípidos.	161
23	Preparados para lactantes. Densitogramas de los PL	162
24	Contenido de gangliósidos, expresado como intervalo de confianza de la media ( $\mu\text{g ASUL/L}$ ), en los preparados para lactantes (test LSD)	165
25	Preparados de continuación. Identificación de gangliósidos por HPTLC	166
26	Preparados de continuación. Densitogramas	167

<b>Figura n°</b>		<b>Página</b>
27	Contenido de gangliósidos, expresado como intervalo de confianza de la media ( $\mu\text{g ASUL/L}$ ), en los preparados de continuación (test LSD)	170
28	Sueros lácteos. Identificación de gangliósidos por HPTLC	171
29	Sueros lácteos. Densitogramas	172
30	Preparados especiales para lactantes. Identificación de gangliósidos por HPTLC	174
31	Preparados especiales para lactantes. Identificación de gangliósidos por HPTLC (reproducido de Pan e Izumi, 2000)	175
32	Leche humana. Identificación de gangliósidos por HPTLC, sin (placa A) o con (placa B) purificación con DEAE-Sephadex	176
33	Ingestas diarias de gangliósidos a partir de preparados para lactantes	178
34	Ácido siálico total. Interacción muestra-etapa de digestión	181
35	Reactividad del ácido siálico en condiciones gástricas	183
36	Ensayos preliminares. Identificación de gangliósidos por HPTLC en Ac1 y Ac2 sin digerir (SD) y sus respectivos digeridos gástricos (DG) y fracciones <i>bioaccesibles</i> (FB), frente a patrón (P)	184
37	Ensayos preliminares. Densitogramas de digestión gástrica (DG) y fracción <i>bioaccesible</i> (FB) de la muestra Ac2	185

<b>Figura n°</b>		<b>Página</b>
38	<i>Bioaccesibilidad.</i> Identificación de gangliósidos por HPTLC de Ac1, Ac2 y LH sin digerir (SD) y sus respectivos digeridos gástricos (DG) y fracciones <i>bioaccesibles</i> (FB) purificados por DEAE-Sephadex y Sep-Pack C18, frente a patrón (P)	187
39	Bioaccesibilidad. Densitogramas de la digestión gástrica (DG) y fracción bioaccesible (FB), purificadas por DEAE-Sephadex y Sep-Pack C18 de las muestras Ac1, Ac2 y LH.	189
40	Gangliósidos. Interacción muestra-etapa de digestión	193
41	Contenido de gangliósidos individuales, expresado como intervalo de confianza de la media ( $\mu\text{g ASUL/L}$ ), en preparados infantiles y leche humana según la etapa digestiva (test LSD)	194
42	Contenido total de gangliósidos individuales. Interacción muestra-etapa de digestión	195
43	Inmunoensayo con anti-Neu5Gc en células Caco-2 no diferenciadas	198
44	Identificación de gangliósidos en células Caco-2 no diferenciadas (ND) y diferenciadas (D) frente a patrón de gangliósidos (P)	200
45	Placas reveladas con orcinol (P, patrón; O, muestra) e inmunoensayo con anti-GM <sub>1</sub> (I)	201
46	Microscopía confocal de fluorescencia de las células Caco-2 diferenciadas	203
47	Ensayo de viabilidad celular con azul tripán	205

<b>Figura n°</b>		<b>Página</b>
48	Ensayo de integridad mitocondrial con MTT	206

## **ABREVIATURAS**

**ASUL:** Ácido siálico unido a lípidos

**BCIP:** 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato

**BD:** Biodisponibilidad

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CV:** Coeficiente de variación

**DG:** Digestión gástrica

**DMB:** 1,2-diamino-4,5-metilendioxi-benceno dihidrocloruro

**DMEM:** Medio mínimo esencial Dubelco

**EAM:** Espectrofotometría de absorción molecular

**EDTA:** Ácido etilendiamintetracético

**EFSA:** Autoridad Europea sobre Seguridad Alimentaria

**ESPGHAN:** Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición

**FB:** Fracción soluble o *bioaccesible*

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**GalCer:** Galactosil ceramida

**GC-MS:** Cromatografía gaseosa con detección de masas

**GG:** Gangliósidos

**GlcCer:** Glucosil ceramida

**HEPES:** Ácido 2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etano sulfónico

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución

**HPTLC:** Cromatografía en capa fina de alta resolución

**LacCer:** Lactosil ceramida

**LC:** Límite de cuantificación

**LC-ESI-MS/MS:** Cromatografía líquida con ionización por electrospray con detección masas-masas

**LD:** Límite de detección

**LH:** Leche humana

**MALDI-TOF-MS:** Desorción de matriz asistida por láser – tiempo de vuelo con detección por masas

**MetOH:** Metanol

**MFGM:** Membranas de los glóbulos grasos de la leche

**MTT:** 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil bromo de tetrazolio

**MWCO:** Peso molecular de corte

**Neu5Ac:** Ácido *N*-acetilneruramínico

**Neu5Gc:** Ácido *N*-glicolilneruramínico

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBIMC:** Poli-isobutilisometacrilato

**PBS:** Tampón de fosfato salino

**PL:** Preparados para lactantes

**PC:** Preparados de continuación

**SD:** Sin digerir

**RD:** Real decreto

**RTS:** Reglamentación técnico sanitaria

**SAT:** Sialiltransferasa

**Sia:** Ácido Siálico

**TBA:** Ácido tiobarbitúrico

**TLC:** Cromatografía en capa fina

# **INTRODUCCIÓN**

El periodo de lactancia es fundamental para un desarrollo físico y psíquico correcto del recién nacido. En esta etapa se deben aportar todos los nutrientes necesarios que aseguren el crecimiento y desarrollo psicomotor del niño, tanto en cantidad como en calidad, teniendo en cuenta que el recién nacido sano no tiene totalmente desarrollados sus órganos, procesos digestivos, metabólicos, funcionamiento renal, sistema inmunitario y el mecanismo de regulación del apetito.

La leche humana (LH) es el alimento ideal para los neonatos pero cuando no es posible utilizarla, se recurre a la alimentación artificial con preparados infantiles. Ya que pueden ser el primer y/o único alimento para el recién nacido, la composición de estos preparados debe ser lo más parecida posible a la LH.

Existe un gran control sobre la composición de los preparados debido a la importancia de la alimentación durante los primeros meses de vida. Organizaciones de gran prestigio, como la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN), el Comité de Codex Alimentarius de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría se encargan de emitir recomendaciones sobre la composición que deben tener estos preparados. Además, la composición de los preparados infantiles viene regulada por la Reglamentación Técnico Sanitaria (RTS) recogida en el Real Decreto 867 de 2008, que es resultado de la transposición de la Directiva Europea 2006/141/CEE. En la RTS se recogen las definiciones del ámbito de la alimentación infantil, y se establecen los requisitos de composición, etiquetado, publicidad e información de los mismos productos.

Tanto en las recomendaciones como en la reglamentación se contempla la composición de macronutrientes, así como la de micronutrientes considerados esenciales. Componentes bioactivos como el ácido siálico (Sia) y los gangliósidos (GG) no se incluyen.

El Sia y los GG desempeñan funciones esenciales en el desarrollo de los recién nacidos. La concentración y formas de ambos componentes en la leche difieren según la especie. Por ello, los preparados infantiles, en su mayoría elaborados a partir de leche de vaca, presentan contenidos y perfiles de Sia y GG diferentes a los de la LH.

Actualmente las industrias del sector de la alimentación infantil intentan desarrollar productos cada vez más parecidos a la LH. Dentro de esta estrategia de mejora, puede ser de interés aproximar los contenidos de Sia y GG de los preparados infantiles a los de la LH. Para ello, una alternativa es la utilización de concentrados proteicos de suero lácteo ricos en Sia y GG, para la elaboración de estos preparados.

Tanto el Sia como los GG han sido extensamente estudiados en tejidos y fluidos biológicos, pero no así en leche y preparados infantiles. Y se desconoce la existencia de trabajos en los que se evalúe la *bioaccesibilidad* de estos compuestos en LH y preparados infantiles.

## **OBJETO Y PLAN DE TRABAJO**

El objetivo general del presente trabajo es el estudio del Sia y los GG (componentes bioactivos) presentes en alimentos destinados a la alimentación del lactante.

Los objetivos concretos son:

- Conocer la composición en Sia y GG de preparados infantiles comercializados y su comparación con la de LH.

- Conocer la influencia de la utilización de concentrados proteicos de suero lácteo ricos en Sia y GG en preparados infantiles experimentales.

- Evaluar las ingestas de Sia y GG a partir de los alimentos destinados a la alimentación del lactante.

- Iniciar estudios de *biodisponibilidad* (BD) *in vitro* de Sia y GG.

Para alcanzar los objetivos mencionados se propone el siguiente plan de trabajo:

- Revisión de los antecedentes bibliográficos relativos a la determinación de Sia y GG en leche y preparados infantiles. Así como los relativos a su funcionalidad, *bioaccesibilidad* y *biodisponibilidad*.

- Puesta a punto y validación de la determinación de Sia en preparados infantiles y concentrados proteicos de suero lácteo por espectrofotometría de absorción molecular (EAM) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

- Determinación de Sia y GG en preparados infantiles, concentrados proteicos de suero lácteo y LH.

- Evaluación de la *bioaccesibilidad* de Sia y GG provenientes de LH y preparados infantiles sometidos a digestión gastrointestinal simulada.

- Caracterización en Sia y GG del cultivo celular de Caco-2.

## **ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

## **1. Alimentación del lactante**

Durante el primer año de vida se produce el crecimiento y desarrollo psicomotriz más importante que tiene lugar en la vida de una persona; en los cuatro primeros meses se dobla el peso de nacimiento y al año éste se triplica. Es esencial asegurar una alimentación suficiente y adecuada para satisfacer las necesidades nutritivas del recién nacido y prevenir diversas situaciones patológicas.

La ESPGHAN (2009) y la OMS (2001) recomiendan la alimentación exclusiva de los recién nacidos con LH hasta los 6 meses, ya que ésta no sólo aporta los nutrientes y componentes necesarios para su desarrollo y protección, si no que favorece el vínculo afectivo que se establece entre la madre y el recién nacido. Cuando no es posible amamantar al lactante, por falta de secreción láctea, patologías de la madre, rechazo del niño, opción personal o cuando esta alimentación resulta insuficiente, se recurre a la alimentación mediante preparados a base de leche de vaca o soja, cuya composición debe parecerse lo más posible a la de la LH.

### **1.1 Leche humana**

La lactancia materna es el alimento idóneo para los recién nacidos. Tras la 54ª Asamblea sobre la Salud Mundial (2001), la OMS establece que durante los 6 primeros meses de vida, la LH es un alimento suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales de los recién nacidos, prestando especial interés a la suplementación de hierro en los países menos desarrollados. A partir de este periodo, la LH puede seguir utilizándose como complemento a una dieta en la que se vayan introduciendo alimentos

correspondientes a distintos grupos. En esta misma asamblea la OMS recomienda que se alargue la lactancia hasta los 2 años de edad. Por otra parte, el Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría fija el tiempo máximo de lactancia en el primer año de vida (Gartner *et al.*, 2005). Recientemente, la ESPGHAN (2009), sin tener en cuenta factores relacionados con la salud, recomienda que la lactancia materna se mantenga tanto como deseen madre e hijo.

No se conocen datos precisos de la prevalencia de la lactancia materna a nivel mundial, si bien en la bibliografía se encuentran estudios a nivel local. Cattaneo *et al.* (2005) evalúan la prevalencia de la lactancia materna en Europa en el año 2003. Según este estudio el porcentaje de madres que inician una lactancia natural se sitúa entre el 63 y el 90%, decayendo a un 30-80% entre el tercer y cuarto mes de lactación, mientras que a los 6 meses se encuentra en 20-60%. Según este estudio, España tiene una prevalencia del 71% en el inicio de la lactación, un 58% a los 3-4 meses y un 40% a los 6 meses, con lo que se sitúa en una zona intermedia, respecto al resto de países europeos. En un estudio previo, Morán (1990) indica que la lactancia natural en España al principio de la lactación, era de un 73,5%, decayendo hasta un 24,9% en los casos en donde se prolongaba más de 3 meses y un 3,1% hasta el año de vida. Se puede decir que no ha mejorado el porcentaje de niños que se inician con la lactancia natural, pero sí el tiempo que se mantiene la misma.

La lactancia materna lleva asociada una serie de ventajas respecto a la alimentación artificial. Diversos estudios establecen que se consiguen efectos beneficiosos durante el periodo de lactancia y también a largo plazo.

Entre los efectos inmediatos se ha descrito que previene frente a infecciones (Chien y Howie, 2001; Quigley *et al.*, 2006) y mejora el desarrollo neuronal incrementando la función cognitiva y habilidad mental (Andersson *et al.*, 1999; Der *et al.*, 2006). A largo plazo, los niños alimentados con LH presentan una menor presión sanguínea (Owen *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005), colesterol total (Owen *et al.*, 2008) y obesidad o sobrepeso (Dewey, 2003) y diabetes tipo II (Owen *et al.*, 2006; OMS, 2007), así como la reducción de problemas relacionados con el sistema inmune, como alergias (Muraro *et al.*, 2003), diabetes tipo I (TRIGR, 2008) y celiaquía (Akobeng *et al.*, 2006).

Estos efectos beneficiosos están relacionados con la composición que presenta la LH. Ésta es muy heterogénea, tanto que para una misma persona varía a lo largo del tiempo, entre días, horas e incluso en una misma toma. Para su estudio se distinguen, como mínimo, tres etapas, si bien la división en distintos periodos no deja de ser artificial, ya que se trata de un proceso constante y continuo de transformación de la leche (Narbona *et al.*, 2005):

- Calostro: es la leche secretada desde el inicio de la lactación (entre las 24 y 48 horas después del parto) hasta los 6 ó 7 días. Es el alimento óptimo transitorio en la adaptación a la vida extrauterina. Además de ser fuente específica de nutrientes, tiene propiedades anti-infecciosas (Walker, 2010).

- Leche de transición: es la que se da entre el 5º-6º día post-parto, hasta la 3ª-4ª semana.

- Leche madura: no comprende un periodo establecido, sino que es la que se da desde los primeros 15 días, ó primer mes, hasta que concluye la lactación.

La energía total es variable, pero en promedio puede considerarse que la leche madura aporta entre 530 y 580 kcal/L, repartidas entre hidratos de carbono (35-50%), grasa (50-55%) y proteínas (5,5%) (Narbona *et al.*, 2005).

La concentración de hidratos de carbono se encuentra entre 70-100 g/L. La lactosa es el componente mayoritario (60-70 g/L), favorece la absorción de calcio y fósforo, así como el crecimiento de la microbiota intestinal (Morán, 1992). El resto de componentes glucídicos se agrupan en la fracción de oligosacáridos, que constituye un 10% (p/v), estando formada por glucosa, galactosa, *N*-acetilglucosamina, fucosa y ácido *N*-acetilneuramínico (componente mayoritario del Sia).

En la leche de vaca, el conjunto de hidratos de carbono, es inferior (40-50 g/L) y está compuesto, prácticamente en su totalidad, por lactosa, los oligosacáridos únicamente representan un 4,8% (p/v) (Maldonado *et al.*, 2010).

La fracción lipídica de la LH representa una concentración de 40-45 g/L, siendo su composición muy variable atendiendo a la dieta de la madre (Giocondi *et al.*, 2010). El 98-99% de esta fracción se compone de triglicéridos, conteniendo un 90% de ácidos grasos de cadena larga, predominando los ácidos palmítico (20%), oleico (38%) y linoleico (15%). En el lactante, estos ácidos grasos se absorben en mayor proporción que los

de cadena corta, y evitan la pérdida de calcio fecal y el aumento de la colesterolemia que inducen los ácidos grasos saturados (García-Onieva, 2007). El resto de componentes de esta fracción son fosfolípidos, ácidos grasos libres, mono y diglicéridos, colesterol y componentes minoritarios, como vitaminas liposolubles y esfingolípidos, entre los que se encuentran los GG.

En la leche de vaca, el contenido total de grasa es muy similar, pero el perfil es significativamente diferente al de la LH. En la leche bovina predominan los ácidos grasos de cadena corta y largos; en general, son saturados (60-70%) (esteárico, mirístico y palmítico), si bien hay ácidos grasos insaturados (oleico 30-40%) y polinsaturados (linolénico 4%). Por otra parte, el perfil de componentes minoritarios también es diferente, con lo que determinados efectos beneficiosos asociados a éstos (inhibición de patógenos asociada a GG), no se dan en niños alimentados con leche bovina (Maldonado *et al.*, 2010).

La cantidad de proteínas en la LH presenta un valor medio de 11 g/L. La fracción caseínica está formada por  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  y  $\gamma$  caseínas, predominando la  $\beta$ -caseína. Son fuente de aminoácidos y fósforo y están involucradas en la absorción de algunos minerales (calcio, magnesio y hierro) (Narbona *et al.*, 2005). En cuanto a las seroproteínas, destaca la ausencia de  $\beta$ -lactoglobulina y la alta concentración de  $\alpha$ -lactoalbúmina, que, además de ser rica en triptófano, es una proteína íntimamente relacionada con la síntesis de lactosa (Heine *et al.*, 1991). La relación caseína/seroproteínas en el calostro es de 10/90, pasando a 40/60 ó 50/50 en leche madura. Esta evolución guarda relación con la mayor digestibilidad de

las seroproteínas y la maduración del sistema digestivo del lactante durante los primeros seis meses de vida. En esta fracción también se encuentran las inmunoglobulinas, fundamentales para la defensa frente a infecciones en las primeras etapas de la vida (Narbona *et al.*, 2005).

La leche de vaca presenta prácticamente el triple de contenido de proteínas (33 – 35 g/L). Aunque su valor biológico es alto, su concentración supone un mayor esfuerzo digestivo y una sobrecarga renal para los recién nacidos. La relación caseína/seroproteínas es 82/18, y en la fracción sérica predomina la  $\beta$ -lactoglobulina, proteína responsable de alergias. Además, el aminograma es diferente para ambas especies; la leche de vaca contiene más tirosina y fenilalanina, y menos cisteína, taurina y triptófano, que la LH, con los problemas de acumulación o déficit que puede suponer en los recién nacidos (Maldonado *et al.*, 2010).

Además, la LH contiene otros compuestos nitrogenados, como los nucleótidos, que favorecen el desarrollo de la microbiota intestinal, la inmunidad humoral y celular (Uauy *et al.*, 1994) e inducen el sueño (Sánchez *et al.*, 2009), la L-carnitina, los factores de crecimiento epidérmico, neuronal y transformador de crecimiento  $\alpha$ , así como aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular (Narbona *et al.*, 2005). En la leche de vaca estos compuestos se encuentran en cantidades inferiores (30% en LH vs. 5% leche de vaca – porcentajes respecto al contenido total de nitrógeno).

En cuanto a las vitaminas y los minerales, la LH presenta una distribución muy heterogénea, ya que sus concentraciones dependen de la

alimentación de la madre y de factores ambientales, si bien, en general, cubre los requerimientos del recién nacido, siendo necesario suplementar únicamente con vitamina D a los prematuros, y con hierro a los recién nacidos en zonas poco desarrolladas. El contenido mineral, aunque es más bajo que en la leche de otras especies, presenta una mayor BD, facilitada por otros componentes de la leche (lactosa, relación Ca/P, etc.) (Roig, 1997; Silvestre, 1998). La leche de vaca triplica el contenido mineral de la humana, si bien algunos de estos minerales (hierro, cobre, cobalto y manganeso) se encuentran en mayor cantidad en esta última. Las vitaminas también tienen una concentración diferente, además se producen pérdidas de algunas de ellas por la recogida, tratamientos térmicos y almacenamiento de la leche de vaca (Maldonado *et al.*, 2010).

## **1.2 Alimentación artificial**

Según Mercasa (2009) durante el año 2008 se vendieron, en España, 71.450 toneladas de productos destinados a la alimentación infantil, de los cuales un 29,9% fueron preparados infantiles, lo que supone un consumo de 30 kilos por niño al año. Por regiones, los consumos más altos, se registran en el sur peninsular, seguido de la zona centro. En el extremo opuesto se sitúan las zonas noreste y norte-centro.

Desde que en 1867 Justus von Liebig elaborase, a nivel industrial, el primer preparado para alimentación infantil, hasta nuestros días, mucho ha cambiado la composición y elaboración de estos productos. En la Unión Europea, estos preparados son regulados por la Directiva 2006/141/CE, transpuesta, en nuestro país, por la RTS específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación (Real Decreto (RD)

867/2008). Esta normativa se basa en las recomendaciones de la ESPGHAN sobre el estándar de composición de “formulas infantiles” (ESPGHAN, 2005) y de “fórmulas de continuación” (ESPGHAN, 1990).

### **1.2.1 Tipos de preparados infantiles**

En la RTS, atendiendo a la edad del lactante, se diferencian dos tipos de productos (RD 867/2008):

- Preparados para lactantes (PL): productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida, que satisfacen por sí mismos las necesidades nutritivas de los lactantes hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada.

- Preparados de continuación (PC): productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes cuando se introduzca una alimentación complementaria apropiada que constituyan el principal elemento líquido de una dieta progresivamente diversificada de los lactantes.

Según Maldonado *et al.* (2005), los PL deberán recomendarse hasta los 6 primeros meses de vida. A partir de este periodo, los lactantes ya han alcanzado una madurez digestiva que permite la introducción de una dieta más diversificada.

La RTS (RD 867/2008) también establece una clasificación de los PL y PC según la fuente proteica utilizada en la elaboración:

- A partir de las proteínas obtenidas de la leche de vaca.

- A partir de hidrolizados de proteínas.

- A partir de aislados de proteínas de soja o de una mezcla con proteínas de la leche de vaca.

Algunos preparados presentan modificaciones para adaptarlos a lactantes con patologías o dificultades digestivas. Se propone la siguiente clasificación de estos preparados (García-Onieva, 2007; Ros, 2009):

- Preparados anti-estreñimiento: contienen triglicéridos modificados, incrementando el número de ácidos grasos insaturados en posición beta, permitiendo así la hidrólisis por las lipasas.

- Preparados anti-cólico: con proteínas parcialmente hidrolizadas, supresión de almidón, y adición de dextrinomaltosa y triglicéridos con ácidos grasos de cadena media.

- Preparados suplementados con nucleótidos: protegen contra enfermedades infecciosas a través de la maduración de los linfocitos T, activación de macrófagos y de células NK.

- Preparados con efecto bifidógeno: contienen probióticos (bifidobacterias ó lactobacilos) y/o prebióticos (fructo y galacto oligosacáridos). El RTS admite la adición máxima de 0,8 g/100mL entre fructo y galacto oligosacáridos.

- Preparados enriquecidos en ácidos grasos omega-3: contribuyen a un óptimo desarrollo psicomotor, agudeza visual y crecimiento. Según la RTS actual, en ambos casos no se puede superar el

1% del contenido total en materia seca, si bien, la ESPGHAN recomienda no superar el 0,5%, ya que no se ha demostrado que la adición en cantidades superiores incremente los efectos beneficiosos.

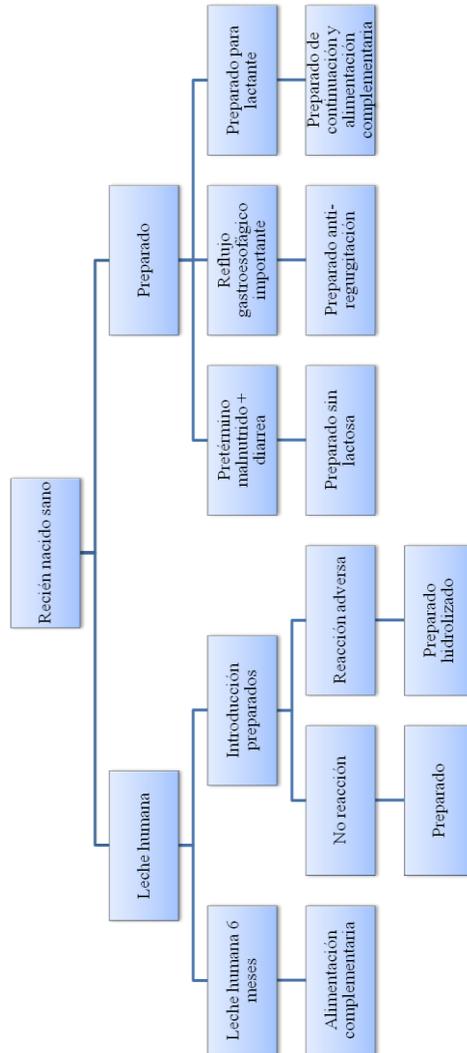
- Preparados anti-regurgitación: se adiciona un espesante, tal como harina de algarrobo, almidón de maíz, o almidón de arroz, que aumenta su viscosidad. Además, se invierte la relación caseína/proteínas del lactosuero, predominando la primera por el efecto tampón que ejerce sobre la acidez gástrica.

- Preparados sin lactosa: se sustituye este azúcar por dextrinomaltosa. Están indicadas en caso de intolerancia a la lactosa.

- Preparados hidrolizados o semielementales: el aporte proteico se suministra en forma de péptidos inferiores a 1500 Da, el glucídico en dextrinomaltosa y el lipídico en triglicéridos de cadena media, con un suplemento de aceite rico en ácidos grasos esenciales. Están indicadas en caso de maldigestión-malabsorción y alergia a proteínas de leche de vaca.

- Preparados de soja: se elaboran a base de jugo de soja en lugar de leche de vaca. Están indicadas en caso de necesidad de dieta exenta de lactosa y/o galactosa, lactantes de familias vegetarianas y alergia a proteínas de leche de vaca.

En la figura nº 1 se esquematiza la forma de seleccionar un preparado u otro atendiendo a la situación fisio-patológica del lactante.



**Figura nº 1.** Algoritmo para la utilización de preparados infantiles (García-Onieva, 2007)

### 1.2.2 Composición de preparados para lactantes y de continuación

La composición para PL y PC se encuentra regulada por la RTS y además deben considerarse las recomendaciones de la ESPGHAN (1990, 2005) (ver anexo 1).

El aporte energético de los preparados infantiles está basado en el de la LH, 60-70 kcal/100mL, aportando el 50-55% de la energía total en forma de grasa, 35-50% en hidratos de carbono y un 5% en proteínas (García-Onieva, 2007).

Los hidratos de carbono según la RTS se pueden encontrar, tanto en PL como en PC, en unas concentraciones de 9 a 14 g/100Kcal. La ESPGHAN recomienda las mismas concentraciones en PL (ESPGHAN, 2005), pero en PC las rebaja a 8 – 12 g /100Kcal (ESPGHAN, 1990). En ambos preparados, esta fracción está constituida fundamentalmente por lactosa, con un contenido mínimo de 4,5 g/100Kcal. La ESPGHAN no da recomendaciones sobre la concentración de este azúcar, ya que considera que no existen suficientes evidencias científicas (ESPGHAN, 2005). La ESPGHAN desaconseja la adición de glucosa y sacarosa en los PL (ESPGHAN, 2005), si bien la RTS permite su adición a PL a base de hidrolizados proteicos. Los PC, además de azúcares como lactosa, sacarosa y glucosa pueden contener fructosa y/o miel, siempre y cuando su contenido, por separado o en conjunto, no supere el 20% de los hidratos de carbono (RD 867/2008); de este modo se asegura una cantidad de lactosa suficiente para favorecer la BD del calcio (Maldonado *et al.*, 2010).

Debe destacarse que, ni la RTS ni la ESPGHAN hacen alusión a la fracción proteica de oligosacáridos y Sia, componentes bioactivos presentes en la LH.

El aporte de lípidos se encuentra entre 4,4 – 6 y 4,0 – 6 g/Kcal para los PL y PC, respectivamente. Ambos intervalos siguen las recomendaciones de la ESPGHAN (ESPGHAN 1990 y 2005). Se permite el uso de grasa animal

y vegetal (excepto aceite de sésamo y algodón) con el fin de conseguir un perfil de ácidos grasos similar al de la LH. Mientras que los PL suelen adicionarse de ácidos grasos esenciales, los PC, en los que se permiten perfiles similares (ver anexo I), no tienen por qué adicionarse, ya que los lactantes pueden ingerirlas de otras fuentes dietéticas, si bien Maldonado *et al.* (2010) recomiendan prestar un interés especial al ácido linoleico (contenido superior a 300 mg/100Kcal) y los ácidos laúrico y mirístico (<20%). En cuanto a los componentes minoritarios, sólo hay legislación y recomendaciones de la cantidad de fosfolípidos, con lo que existe un vacío en lo referente a glicolípidos, como los GG.

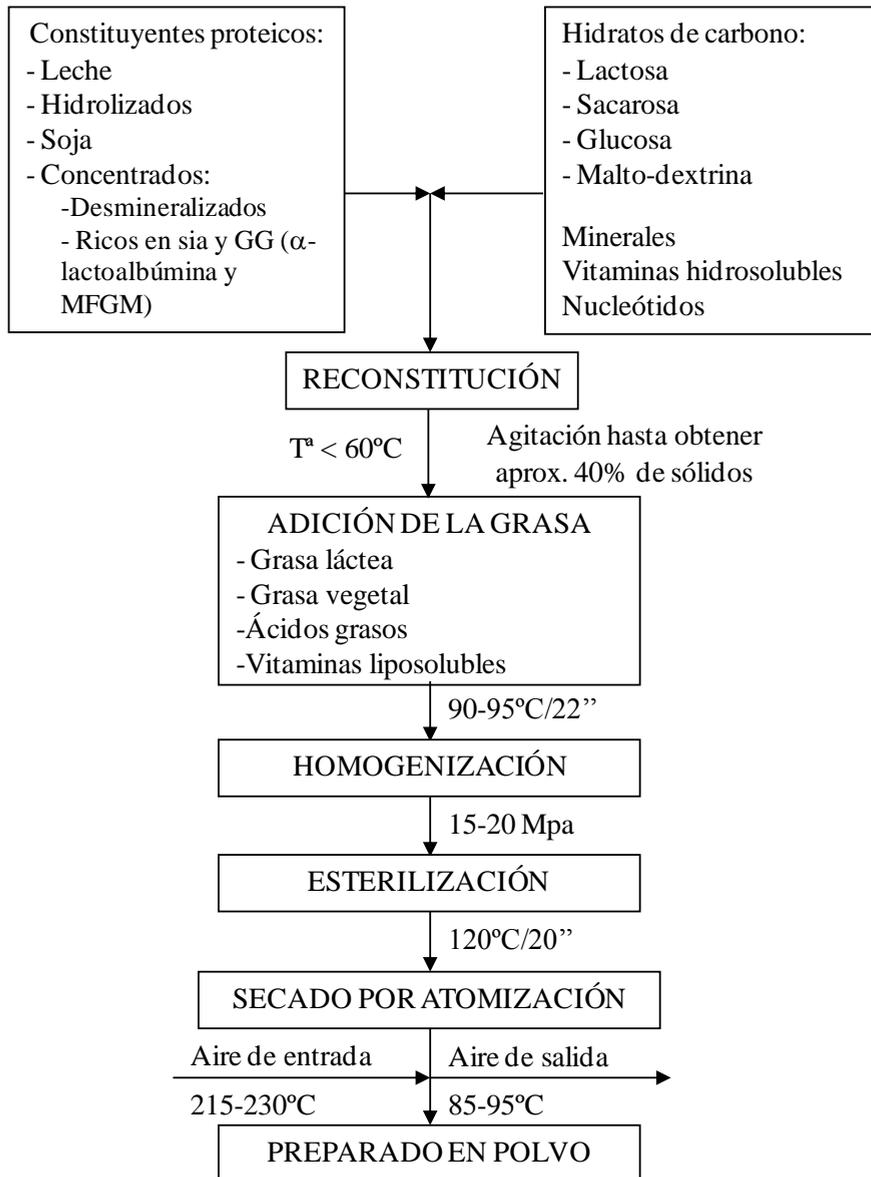
El contenido proteico, atendiendo a la RTS, se encuentra entre 1,8 y 3,0 g/kcal en PL y 1,8 y 3,5 en PC. Los PL se ajustan a las recomendaciones (ESPGHAN, 2005), mientras que los PC tienen un contenido inferior al recomendado en 1990 por la ESPGHAN, que es de 3 a 4,5 g/Kcal. La desviación del valor legislado frente al recomendado se debe a que en la actualidad los PC son un complemento dentro de una dieta diversificada, y no un alimento único y suficiente. De hecho Maldonado *et al.* (2010) consideran que un contenido proteico entre 1,3 y 1,7 g/Kcal es suficiente. El índice químico, en ambos preparados, debe ser superior al 80% del de la LH (García-Onieva, 2007). En cuanto a la relación caseína/seroproteínas, ni la RTS ni el ESPGHAN hacen mención alguna, si bien algunos autores indican que en los PL debe ser 40/60 para imitar la relación encontrada en la LH, y en los PC 60/40 aunque no es tan estricto; de hecho, se pueden encontrar preparados con una relación caseína/seroproteínas 80/20 (García-Onieva, 2007; Ros, 2009; Maldonado *et al.*, 2010). En PL y PC está prohibida la adición de ingredientes que contengan gluten.

Los componentes nitrogenados no proteicos se ven representados por la adición de aminoácidos, pequeños péptidos (fundamentalmente en preparados hidrolizados) y nucleótidos. La concentración máxima de nucleótidos debe ser de 5 mg/100Kcal (RD 867/2008), la American Society for Nutritional Sciences admite la adición de hasta 16 mg/100Kcal (Maldonado *et al.*, 2010).

Los micronutrientes como las vitaminas y los minerales tienen un perfil muy definido, dentro de la legislación, para obtener valores similares a los de la LH (ver anexo I). Según la legislación, el único mineral que debe encontrarse en mayor proporción en los PC, respecto a los PL, es el hierro. En los PL se observan diferencias, entre la RTS (RD 867/2008) y las recomendaciones de la ESPGHAN (2005), para cobre, manganeso y flúor. El contenido legislado sobre vitaminas es acorde a las recomendaciones.

### **1.2.3 Elaboración de preparados infantiles**

Actualmente, la mayoría de los preparados comercializados son productos sólidos que se obtienen a partir de leche y la adición de ingredientes, o mediante disolución y/o emulsión-mezcla de todos sus ingredientes en agua. En la figura nº 2 se esquematiza el proceso propuesto por Contreras (2008) ligeramente modificado:



**Figura n° 2.** Esquema general de la elaboración de preparados infantiles en polvo.

El proceso comienza con una etapa de reconstitución y mezclado de los constituyentes proteicos, hidratos de carbono, minerales, vitaminas liposolubles y nucleótidos en la que se calienta ligeramente la disolución

generada para conseguir fluidificarla. A continuación se adiciona la grasa y vitaminas liposolubles y se homogeneiza la mezcla aplicando fuerzas de cizalla para lograr que todos los componentes entren en contacto y así se produzca su emulsión. El producto resultante se esteriliza, para eliminar la actividad microbiana y enzimática. Se concluye con una etapa de secado que, en general, se realiza por atomización (Contreras, 2008).

De los ingredientes utilizados para la elaboración de los preparados, son de especial interés, para este trabajo, los concentrados proteicos, ya que son fuente de Sia y GG. En una patente sobre preparados enriquecidos en Sia y GG se recomienda la adición de estos compuestos a partir de concentrados proteicos, y no por separado (WO 2008/005032).

Los concentrados proteicos se obtienen a partir de subproductos de la industria quesera, como el lactosuero. Según la RTS (RD 876/2008), “el lactosuero ha de obtenerse por precipitación enzimática de las caseínas, mediante el empleo de quimosina”. El lactosuero una vez obtenido se clarifica, ultrafiltra y seca obteniéndose concentrados de proteína en polvo. Además, puede intercalarse una etapa de desmineralización, previa al secado en cuyo caso se obtiene concentrado proteico desmineralizado (Mahaut *et al.*, 2004). Estos concentrados pueden enriquecerse con  $\alpha$ -lactalbúmina, debido a su alto contenido en aminoácidos esenciales, su contenido en Sia (1,8 g/100g; Hopper y McKenzie, 1973) y funcionalidad biológica, descrita previamente. También pueden enriquecerse con las membranas de los glóbulos grasos de la leche (MFGM), ricas en componentes bioactivos como el Sia (892,2  $\mu$ g/100g) y los GG (113,2  $\mu$ g/100g) (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009). El MFGM se obtiene a partir de la

grasa láctea tras centrifugación de la leche. La grasa se lava con 3-15 volúmenes de agua seguido de una disolución de sacarosa salina tamponada, una disolución de tampón fosfato isotónico y, en algunos casos, con algún detergente o agente disociante; este proceso se realiza al menos, por triplicado. Tras los lavados, el MFGM se libera del núcleo de triglicéridos a la fase acuosa al batir a bajas temperaturas. La extracción tras el lavado también puede llevarse a cabo mediante el uso de disolventes polares, sales biliares o detergentes no aniónicos, si bien con este tipo de extracción no se consigue un rendimiento tan alto como con el batido (Dewettinck *et al.*, 2008).

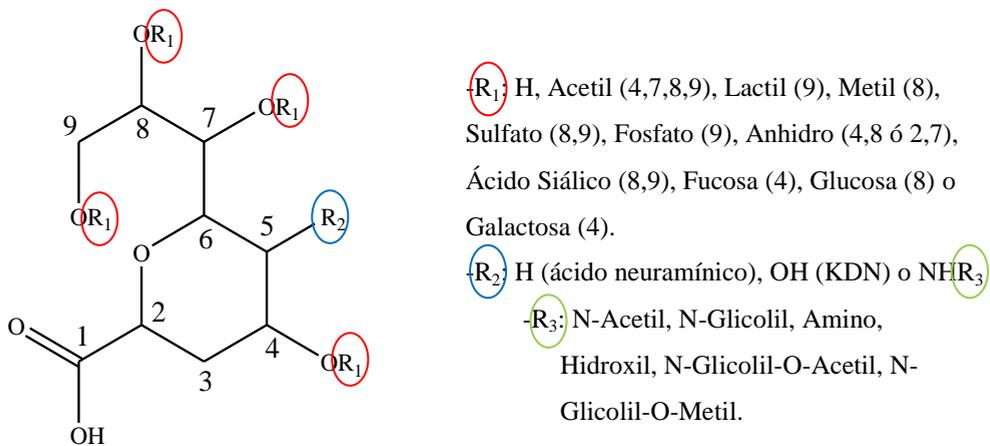
## 2. Ácido siálico

### 2.1 Estructura

Los primeros compuestos descritos como Sia fueron aquellos que se encontraron formando parte de las glicoproteínas de mucinas salivares (Blix, 1936) y de GG de cerebro (Klenk, 1941), de hecho la palabra siálico proviene del griego *sialos*, que significa saliva. En la leche, por una parte Kuhn y Brossmer (1954) encontraron un compuesto, similar al descrito por Blix y Klenk, al que denominaron ácido lactámico; por otra Zilliken *et al.* (1955) descubrieron el mismo compuesto y lo denominaron ácido ginamínico. Ambos resultaron ser formas de Sia. Con el fin de homogenizar la nomenclatura de estos compuestos, Blix, Gottschalk y Klenk (Blix *et al.*, 1957) utilizaron el nombre de “ácido siálico” para definir a la familia de compuestos que presentasen una estructura de  $\alpha$ -ceto azúcares ácidos de 9 carbonos con una amina en el carbono 5. En la actualidad, Varki y Schauer (2009) han propuesto incluir los compuestos que tienen un hidroxilo en el carbono 5 (KDN). Hoy en día esta familia aglutina más de 50 compuestos.

La variabilidad, dentro del Sia, se debe a modificaciones naturales sobre la estructura básica (ver figura nº 3). Las sustituciones más comunes (Angata y Varki, 2002) se dan sobre el nitrógeno unido al carbono 5 (C-5) como se indica en la figura nº 3, donde se puede encontrar un grupo amino (con sus respectivas sustituciones) o hidroxilo (KDN). También puede darse que en C-5 no haya ninguna sustitución (ácido neuramínico). A partir de estas moléculas pueden producirse sustituciones adicionales sobre los hidroxilos de los carbonos C-4, C-7, C-8 y/o C-9. Además de estas

sustituciones, también se han encontrado formas insaturadas y/o anhidro. El grupo carboxilo en C-1 ( $pK_a = 2,6$ ; Zubay y Strominger, 1988), en condiciones fisiológicas, se encuentra ionizado, o condensado, en forma de lactona (con algún grupo hidroxilo de azúcares) o en forma de lactama (con un grupo amino libre en C-5 de otro Sia). También pueden formar heterodisacáridos, por unión de fucosa o galactosa al C-4 y glucosa al C-8. Además pueden producirse polimerizaciones, siendo la unión más habitual la  $\alpha$ -2-8.



**Figura nº 3.** Estructura básica y sustituciones del ácido siálico.

En cuanto a la nomenclatura, no existe una normativa para simplificar la notación de estos compuestos, si bien existe un consenso en la denominación de éstos; la estructura básica se conoce como “Neu”, para el ácido neuramínico. Las sustituciones se designan con un código de letras (Ac – acetilo, Gc – glicolil, Me – metilo, Lt – lactilo, S – sulfato) precedido por un número que indica la posición de la sustitución. Por otra parte, para

nombrar a un grupo de ácidos siálicos, sin diferenciar entre ellos, se usa la abreviatura genérica “Sia” (Varki y Schauer, 2009).

En el cuadro n° 1 se muestran el nombre completo y la abreviatura de los Sia conocidos hasta 2002 (Angata y Varki, 2002).

**Cuadro n° 1.** Nombre completo y abreviatura de los ácidos siálicos conocidos hasta 2002 (Angata y Varki, 2002).

	<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Abreviatura</b>
Ácido	neuramínico	Neu
Ácido	neuramínico 1,5-lactama	Neu1,5lactama
Ácido	5- <i>N</i> -acetilneuramínico	Neu5Ac
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-4- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu4,5Ac <sub>2</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-7- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu5,7Ac <sub>2</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-8- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu5,8Ac <sub>2</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-9- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu5,9Ac <sub>2</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-4,9-di- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu4,5,9Ac <sub>3</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-7,9-di- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu5,7,9Ac <sub>3</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-8,9-di- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu5,8,9Ac <sub>3</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-4,7,9-tri- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu4,5,7,9Ac <sub>4</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-7,8,9-tri- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu5,7,8,9Ac <sub>4</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-4,7,8,9-tetra- <i>O</i> -acetilneuramínico	Neu4,5,7,8,9Ac <sub>5</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu5Ac9Lt
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-4- <i>O</i> -acetil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu4,5Ac <sub>2</sub> 9Lt
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-7- <i>O</i> -acetil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu5,7Ac <sub>2</sub> 9Lt
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-8- <i>O</i> -metilneuramínico	Neu5Ac8Me
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-9- <i>O</i> -acetil-8- <i>O</i> -metilneuramínico	Neu5,9Ac <sub>2</sub> 8Me
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-8- <i>O</i> -sulfoneuramínico	Neu5Ac8S
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-4- <i>O</i> -acetil-8- <i>O</i> -sulfoneuramínico	Neu4,5Ac <sub>2</sub> 8S
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-9- <i>O</i> -fosfoneuramínico	Neu5Ac9P
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-2-deoxi-2,3-didehidroneuramínico	Neu2en5Ac
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-9- <i>O</i> -acetil-2-deoxi-2,3-didehidroneuramínico	Neu2en5,9Ac <sub>2</sub>
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-2-deoxi-2,3-didehidro-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu2en5Ac9Lt
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-2,7-anhidroneuramínico	Neu2,7an5Ac
Ácido	5- <i>N</i> -acetilneuramínico 1,7-lactona	Neu5Ac1,7lactona
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-9- <i>O</i> -acetilneuramínico 1,7-latona	Neu5,9Ac <sub>2</sub> 1,7latona
Ácido	5- <i>N</i> -acetil-4,9-di- <i>O</i> -acetilneuramínico 1,7-latona	Neu4,5,9Ac <sub>3</sub> 1,7latona
Ácido	5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu5Gc
Ácido	4- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu4Ac5Gc
Ácido	7- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu7Ac5Gc
Ácido	8- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu8Ac5Gc
Ácido	9- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu9Ac5Gc
Ácido	4,7-di- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu4,7Ac <sub>2</sub> 5Gc
Ácido	4,9-di- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu4,9Ac <sub>2</sub> 5Gc
Ácido	7,9-di- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu7,9Ac <sub>2</sub> 5Gc

**Cuadro n° 1 (continuación).** Nombre completo y abreviatura de los ácidos siálicos conocidos hasta 2002 (Angata y Varki, 2002).

	<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Abreviatura</b>
Ácido	8,9-di- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu8,9Ac <sub>2</sub> 5Gc
Ácido	7,8,9-tri- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu7,8,9Ac <sub>3</sub> 5Gc
Ácido	5- <i>N</i> -glicolil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu5Gc9Lt
Ácido	4- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu4Ac5Gc9Lt
Ácido	8- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu8Ac5Gc9Lt
Ácido	4,7-di- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu4,7Ac25Gc9Lt
Ácido	7,8-di- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu7,8Ac25Gc9Lt
Ácido	5- <i>N</i> -glicolil-8- <i>O</i> -metilneuramínico	Neu5Gc8Me
Ácido	9- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolil-8- <i>O</i> -metilneuramínico	Neu9Ac5Gc8Me
Ácido	7,9-di- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glicolil-8- <i>O</i> -metilneuramínico	Neu7,9Ac <sub>2</sub> 5Gc8Me
Ácido	5- <i>N</i> -glicolil-8- <i>O</i> -sulfoneuramínico	Neu5Gc8S
Ácido	5- <i>N</i> -glicolil-9- <i>O</i> -sulfoneuramínico	Neu5Gc9S
Ácido	5- <i>N</i> -( <i>O</i> -acetil)glicolilneuramínico	Neu5GcAc
Ácido	5- <i>N</i> -( <i>O</i> -metil)glicolilneuramínico	Neu5GcMe
Ácido	2-deoxi-2,3-didehidro-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu2en5Gc
Ácido	9- <i>O</i> -acetil-2-deoxi-2,3-didehidro-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu2en9Ac5Gc
Ácido	2-deoxi-2,3-didehidro-5- <i>N</i> -glicolil-9- <i>O</i> -lactilneuramínico	Neu2en5Gc9Lt
Ácido	2-deoxi-2,3-didehidro-5- <i>N</i> -glicolil-8- <i>O</i> -metilneuramínico	Neu2en5Gc8Me
Ácido	2,7-anhidro-5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu2,7an5Gc
Ácido	2,7-anhidro-5- <i>N</i> -glicolil-8- <i>O</i> -metilneuramínico 1,7-latona	Neu2,7an5Gc8Me
Ácido	5- <i>N</i> -glicolilneuramínico	Neu5Gc1,7latona
Ácido	2-ceto-3-deoxinonónico	KDN
Ácido	5- <i>O</i> -acetil-2-ceto-3-deoxinonónico	KDN5Ac
Ácido	7- <i>O</i> -acetil-2-ceto-3-deoxinonónico	KDN7Ac
Ácido	9- <i>O</i> -acetil-2-ceto-3-deoxinonónico	KDN9Ac
Ácido	4,5-di- <i>O</i> -acetil-2-ceto-3-deoxinonónico	KDN4,5Ac <sub>2</sub>
Ácido	4,7-di- <i>O</i> -acetil-2-ceto-3-deoxinonónico	KDN4,7Ac <sub>2</sub>
Ácido	5,9-di- <i>O</i> -acetil-2-ceto-3-deoxinonónico	KDN5,9Ac <sub>2</sub>
Ácido	7,9-di- <i>O</i> -acetil-2-ceto-3-deoxinonónico	KDN7,9Ac <sub>2</sub>
Ácido	8,9-di- <i>O</i> -acetil-2-ceto-3-deoxinonónico	KDN8,9Ac <sub>2</sub>
Ácido	2-ceto-3-deoxi-5- <i>O</i> -metilnonónico	KDN5Me
Ácido	2-ceto-3-deoxi-9- <i>O</i> -fosfononónico	KDN9P

## 2.2 Presencia y distribución en organismos vivos

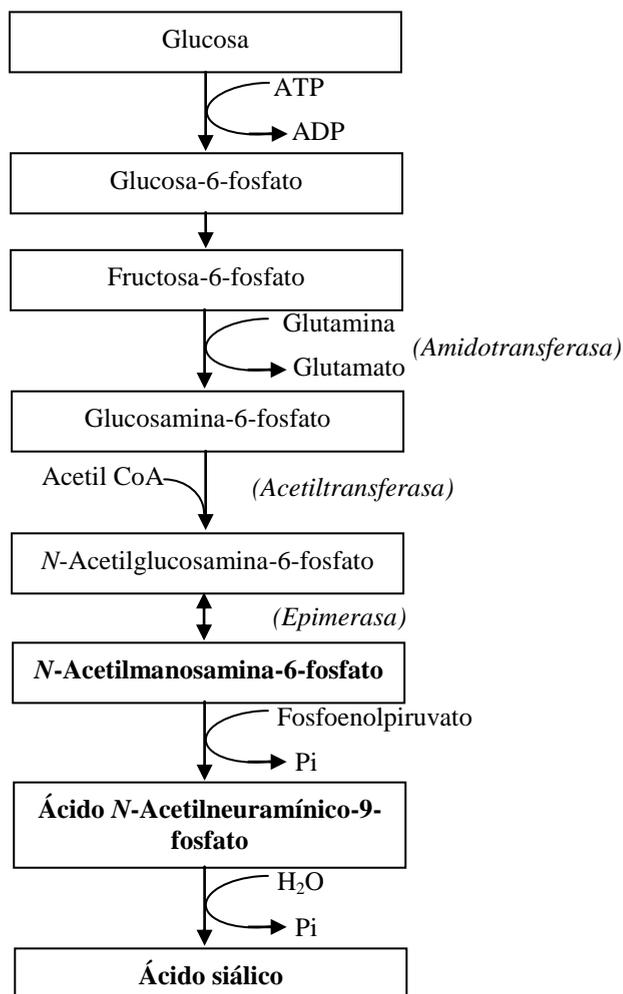
El Sia se encuentra en todos los tejidos y fluidos biológicos de los vertebrados superiores. En menor medida también se ha descrito en invertebrados inferiores, hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*), bacterias (*Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*), protistas (*Entamoeba histolytica*, *Theileria sergenti*), arqueas, virus y células procariotas (Varki, 1999; Reglero *et al.*, 2007; Lehmann *et al.*,

2006). Cada especie sintetiza Sia de forma específica. Su distribución en tejidos y fluidos biológicos es característica para cada organismo, pudiendo variar sus contenidos a lo largo de la vida o según las condiciones ambientales (Becker y Ramman, 1995; Rahmann y Jonas, 1998).

Las tres formas más frecuentes que se encuentran en la naturaleza son los ácidos *N*-Acetilneuramínico (Neu5Ac), *N*-Glicolilneuramínico (Neu5Gc) y *N*-acetil-9-*O*-acetilneuramínico, siendo el Neu5Ac el único que se encuentra en todas las especies (Schauer, 2004). Habitualmente el Sia se encuentra formando glicoconjugados (con lípidos, proteínas o polisacáridos) ó como moléculas terminales de cadenas de glicanos; mientras que la proporción de Sia libre es muy baja (3%) (Varki y Schauer, 2009).

El Sia puede sintetizarse *de novo* a partir de glucosa u otros productos de la glucólisis, siguiendo la ruta de síntesis de aminoazúcares, siendo su precursor la *N*-Acetilglucosamina-6-fosfato (ver figura nº4).

La transferencia del Sia a los glicanos, para generar glicoconjugados, se cataliza por la acción de enzimas específicas conocidas como sialiltransferasas (SAT), mientras que la eliminación del Sia de los sialoconjugados se cataliza por sialidasas. La modificación del Sia también está mediada por enzimas específicas, en particular, la conversión de Neu5Ac a Neu5Gc por la hidroxilasa CMP-Neu5Ac (codificada por el gen CMAH).



**Figura nº 4.** Esquema de la ruta de biosíntesis de ácido siálico (Martínez y Suárez, 2010).

En el organismo humano el Sia se localiza principalmente en el hígado (16,0 mg/100g peso húmedo), riñones (35,5 mg/100g peso húmedo), plasma (63,0 mg/100g peso húmedo), saliva (65,2 mg/L), cerebro (89,0 mg/100g peso seco), semen (105,5 mg/100g peso húmedo) y leche (300-

1500 mg/L) (Svennerholm, 1958; Tram *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998, 2001).

Debe destacarse que la forma Neu5Gc no puede ser sintetizada por el ser humano (carencia del gen CMAH), por lo que su presencia en tejidos y fluidos es prácticamente nula. Se ha descrito que el porcentaje de Neu5Gc respecto al Sia total es <1% en hígado, riñones y piel, en bazo y testículos 1%, en corazón 2% y en cerebro 0,01% (Schröder *et al.*, 1983; Muchmore *et al.*, 1998). También se ha detectado su presencia en el meconio de los neonatos y en tejido tumoral o en el plasma de pacientes con ciertos tipos de cánceres como colon, retina, piel y mama (Malykh *et al.*, 2001; Tzanakakis *et al.*, 2006). En el resto de mamíferos es una forma habitual e incluso mayoritaria (Varki, 2001).

El Neu5Gc, ingerido a través de la dieta, es rápidamente hidrolizado o excretado por la orina, en su práctica totalidad, en ausencia de patologías. Tangvoranuntakul *et al.* (2003) detectan un aumento en el contenido de Neu5Gc en la mucina salivar, 48 horas después de la administración de 140 mg de éste, junto a una dieta vegetariana. Los autores hipotetizan que también debe encontrarse en la mucina intestinal. A partir de este estudio, Bardor *et al.* (2005) demuestran que la adición de Neu5Gc a concentraciones 3 mM a células Caco-2 (modelo validado de epitelio intestinal) aumenta su contenido en un 60%, a los 3 días de la adición, respecto al control.

La presencia de Neu5Gc, a nivel intestinal, puede inducir la adhesión de ciertas toxinas que reconocen específicamente esta forma de Sia, como la Shiga producida por *E. coli* (Byres *et al.*, 2008). Esta toxina puede

desencadenar el síndrome urémico hemolítico, con lo que algunos autores relacionan la ingesta de Neu5Gc con este síndrome (Löfling *et al.*, 2009).

Además, la acumulación de Neu5Gc causa desórdenes inmunológicos debido al aumento de la concentración de anticuerpos IgA, IgM e IgG (Wang, 2009).

### **2.3 Funciones**

El Sia ejerce distintas funciones de reconocimiento celular, con implicaciones en diversos procesos biológicos y patológicos por su posición terminal en las moléculas de las que forma parte y su carga negativa a pH fisiológico. Es fundamental para el desarrollo cerebral, está relacionado con procesos de inflamación y se puede usar como indicador de ciertas patologías. El Sia está directamente relacionado con la funcionalidad de los glicosfingolípidos que lo contienen, detallada más adelante. La ESPGHAN (2009) destaca el importante papel del Sia en el desarrollo cerebral de los recién nacidos.

En particular, las funciones más destacadas son:

- Acción frente a infecciones: tanto las bacterias como los virus, utilizan los carbohidratos como factores de reconocimiento para anclarse a las células hospedadoras. Este anclaje es el primer paso para inducir una infección (Wang y Brand-Miller, 2003).

La presencia de Sia unido a mucina soluble, en forma libre ó en glicoconjugados, tras la ingesta de alimentos, puede actuar como falso

receptor de enterobacterias, protegiendo al epitelio intestinal (Newburg, 1999). También se ha descrito que previene la unión de rotavirus (Varki, 1993) y enterotoxinas (Idota *et al.*, 1995).

Angata y Varki (2002) postulan que el organismo modifica la estructura del Sia, presente en las membranas celulares, para no ser reconocido por los patógenos. Esto explicaría la gran cantidad de estructuras conocidas de Sia. Debido a que los patógenos tienen una capacidad de replicación mucho mayor que la de las células hospedadoras, este mecanismo de defensa no es suficientemente efectivo. Aún así, gracias a las diferencias en la estructura de Sia, entre distintas especies, se evita que ciertos patógenos superen la barrera de la especie.

- Desarrollo neuronal: las moléculas adhesivas presentes en células neuronales son inmunoglobulinas ampliamente distribuidas en la superficie de las células del sistema nervioso central. Se encargan de regular la migración celular, el crecimiento de las neuritas, la elongación de los axones y la formación de la unión sináptica. Su estructura contiene polímeros de Sia, formados por 150 – 180 unidades de éste. Las cadenas de polímeros de Sia son de vital importancia en neurobiología, ya que regulan la funciones de estas inmunoglobulinas durante el desarrollo cerebral (Nakata y Troy, 2005). Durante la ontogenia, la expresión de los polímeros de Sia es muy abundante, tras el nacimiento decae, pero sigue expresándose en determinadas regiones del cerebro adulto, para generar plasticidad en membranas neuronales (Ong *et al.*, 1998) y regenerar el sistema nervioso (Oumesmar *et al.*, 1995).

El Sia es un buen sustrato para el desarrollo de cultivos celulares del sistema nervioso, como las células Schwann, encargadas de generar la mielina de las neuronas periféricas, ejerciendo un papel crucial durante los fenómenos de regeneración. Al respecto, Haile *et al.* (2007) proponen que se podrían utilizar los polímeros de Sia para realizar bioimplantes en reconstrucciones de tejido nervioso periférico, o reparar áreas dañadas del sistema nervioso central.

- Efecto anti-inflamatorio: el Sia disminuye la afinidad de los anticuerpos IgG sobre los receptores Fc. Los individuos con patologías autoinmunes, por ejemplo con artritis reumatoide, presentan los anticuerpos IgG sin Sia y sin galactosa en el residuo 297 de la fracción Fc (dónde en condiciones normales están presentes). Los anticuerpos con altos contenidos de Sia tienen disminuida su afinidad con los receptores celulares, con lo que tienen un efecto anti-inflamatorio (Nimmerjahn *et al.*, 2007).

- Indicadores de patologías: diversos estudios muestran que variaciones en el contenido de diferentes tipos de Sia, están correlacionados con ciertas patologías. Un aumento del contenido plasmático de Neu5Gc es indicador de ciertos tipos de cánceres, como se ha comentado anteriormente (Tzanakakis *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2006).

Debe destacarse que, recientemente, ha sido publicado un informe de la Autoridad Europea sobre Seguridad Alimentaria (EFSA), en base a la propuesta de declaración de propiedad saludable, relativa al Sia como ingrediente activo del Lacprodan CGMP-10 (artículo 13.1, declaración de propiedades saludables distintas de las relativas a la reducción de riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños, Reglamentos 1924/2006

y 109/2008. La declaración saludable solicitada es: “está involucrado en el desarrollo cerebral”, concretado este efecto como “el Sia puede mejorar el aprendizaje y la memoria”. A pesar de que la EFSA considera que el Sia está suficientemente caracterizado, el informe ha sido desfavorable debido a la falta de estudios causa-efecto que relacionen la ingesta dietética de Sia y la mejora del aprendizaje y la memoria en humanos (EFSA, 2009).

#### **2.4 Métodos de determinación en muestras biológicas y productos lácteos**

La determinación de Sia es importante tanto en tejidos y fluidos biológicos, como en alimentos. Se puede determinar como Sia total, libre e incluso puede diferenciarse entre distintas formas.

Para la determinación del Sia total, como suele estar unido a otros componentes, se precisa una etapa de hidrólisis con el fin de liberarlo, seguido de una etapa de purificación y determinación por diferentes técnicas analíticas, como son las espectrofotométricas y cromatográficas.

Si se desea conocer el Sia unido a proteínas, glúcidos o lípidos, se requiere una etapa previa a la hidrólisis y purificación, para aislar estas fracciones.

Para el proceso de hidrólisis se han descrito dos posibilidades: hidrólisis ácida o enzimática. La primera es la más ampliamente utilizada, ya que es una técnica sencilla, reproducible, barata y asegura una liberación total de las moléculas de Sia, si bien se han descrito pérdidas de un 10% (Schauer y Corfield, 1982). En general se utilizan condiciones de acidez

moderada, combinada con calentamiento (entre 70 y 90°C) en un horno, placa o bloque calefactor. El ácido más utilizado es el sulfúrico diluido. También se ha propuesto la utilización de ácido clorhídrico diluido, ácido acético combinado con microondas, hidrosulfito sódico, ácido trifluoroacético y ácido fórmico (ver cuadros nº 2 a 4).

En la hidrólisis enzimática, las moléculas de Sia se liberan por la acción de neuraminidasas aisladas de diferentes microorganismos (*Vibrio cholerae* y *Arthrobacter ureafaciens*) (Sugahara *et al.*, 1980). El problema que presenta esta técnica es que no es sencillo controlar la cascada de reacciones que tienen lugar, ya que dependen de la estructura del Sia, de la enzima y del tejido o fluido objeto del análisis.

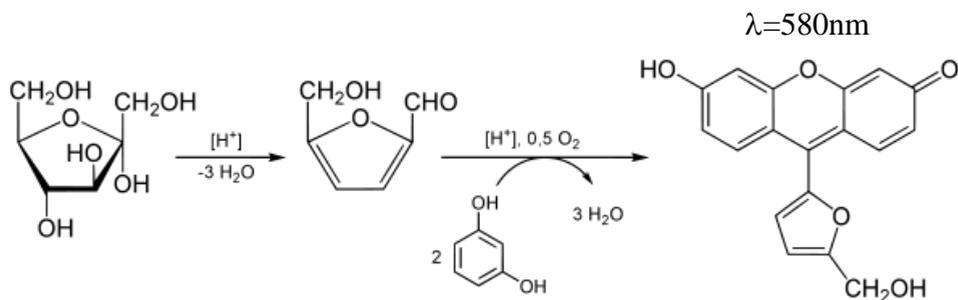
Spitchig *et al.* (2010) optimizan las condiciones de hidrólisis comparando la hidrólisis con ácido fórmico (0,5M, 2h, 80°C), sulfúrico (0,05M, 1h, 80°C) y sialidasas (neuranimidasas, 1,5h, 37°C). Las hidrólisis ácidas inducen pérdidas de Sia similares, si bien el ácido fórmico mejora los factores de respuesta de los picos correspondientes al Neu5Ac y Neu5Gc derivatizado, si se realiza una determinación por HPLC-fluorescencia. Por otra parte el uso de sialidasas hace que el pico de Neu5Gc coeluya con interferentes no identificados.

Debido a la complejidad de las muestras biológicas y los productos lácteos, es necesaria una etapa de purificación tras la hidrólisis. El método más común es la cromatografía de intercambio aniónico (Dowex) (ver cuadros nº 2 a 4) donde el Sia queda retenido, eluyéndose con un ácido (generalmente ácido fórmico 1N) tras eliminar las impurezas por filtración y lavado. Otras posibilidades de purificación son el uso de cartuchos de

extracción en fase sólida (Sep-Pack C18) (Siskos y Spyridiaki, 1999) aplicado a muestras biológicas, o la ultracentrifugación en productos lácteos (Martín *et al.*, 2007; Spichtig *et al.*, 2010). Estos dos métodos se recomiendan para muestras con pocos interferentes, o previamente purificadas por cromatografía de intercambio aniónico. Spichtig *et al.* (2010), sin embargo, en muestras complejas, como leche y derivados (concentrado proteico de suero bovino, leche en polvo, leche de crecimiento, preparados infantiles, cereales infantiles, yogurt y leche malteada líquida y en polvo) utilizan únicamente la ultracentrifugación para la determinación de Neu5Ac y Neu5Gc por HPLC-fluorescencia.

Los métodos espectrofotométricos han sido los primeros utilizados en la determinación de Sia y se basan en la similitud que presentan éstos con los azúcares, adaptándose métodos de determinación de azúcares a la determinación del Sia (ver cuadro nº 2). En general, son métodos poco selectivos que no permiten diferenciar las distintas formas del mismo.

El método en el que utiliza resorcinol (Seliwanoff, 1887), adaptado por Svennerholm para el Sia y aplicado a fluidos biológicos y tejidos humanos (Svennerholm 1957, 1958), es el más utilizado. El método se basa en la reacción del resorcinol con los azúcares dando lugar a un producto coloreado cuyo máximo de absorción se encuentra a 580nm (ver figura nº 5). Este método se ha utilizado para determinar Sia en tejidos y fluidos biológicos (Svennerholm, 1958), leche (Neeser *et al.*, 1991) y preparados infantiles (Sánchez-Díaz *et al.*, 1997).



**Figura nº 5.** Reacción de una cetosa con resorcinol (Seliwanoff, 1887).

El método del ácido tiobarbitúrico (TBA) ha sido desarrollado y aplicado en fluidos biológicos (Warren, 1959) y leche (Carlson, 1985). Está basado en la reacción entre el TBA y el Sia tras haberse oxidado éste en condiciones ácidas, pudiendo realizarse la detección por vía fluorimétrica o espectrofotométrica en el visible.

El método enzimático consiste en una secuencia de reacciones donde, tras liberarse el Sia por la acción de neuraminidasas, se transforma a piruvato el cual se determina por el ensayo del peróxido de hidrógeno (Sugahara et al, 1980). La ventaja de este método es su comercialización como un kit sencillo y rápido, pero es caro y sólo se aconseja usarlo cuando la muestra tenga contenidos bajos de Sia.

Crook *et al.* (1993) comparan los tres métodos (resorcinol, TBA y enzimático) para la determinación de Sia (0-6,4 mM) en fluidos biológicos. No encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ellos. El límite de detección para cada uno de ellos lo establecen en 0,12, 0,20 y

0,06mM, la repetibilidad en un 6,1, 8,2 y 3,9%, y la reproducibilidad en un 4,5, 3,1 y 4,0% para el resorcinol, TBA y enzimático, respectivamente.

La determinación de Sia por HPLC puede realizarse con o sin derivatización previa, para su detección por fluorescencia o ultravioleta (UV), respectivamente. Si el análisis se lleva a cabo sin derivatización, se opta por usar la técnica del par iónico empleando como reactivo triisopropanolamina (Spyridiaki y Siskos, 1999). Esta técnica permite diferenciar entre las formas Neu5Ac y Neu5Ac<sub>2</sub> en suero, orina y saliva, previa purificación para la eliminación de proteínas. En disoluciones patrón se llegan a identificar las mismas formas, además de Neu5Gc, Neu5,9Ac<sub>2</sub> y CMP-Neu5Ac.

Como reactivo derivatizante comenzó a utilizarse el 1,2-diamino-4,6-dimetoxibenzeno, para la determinación de Neu5Ac y Neu5Gc en suero y orina, obteniendo un límite de detección de 12 pmoles en ambos casos (Hara *et al.*, 1986) pero se obtenían reacciones paralelas con algunos interferentes. A continuación se utilizó el 1,2-diamino-4,5-metilenedioxibenzeno (DMB) que es más selectivo (Hara *et al.*, 1987). Este último se ha utilizado para la determinación de Neu5Ac y Neu5Gc en glicoproteínas, como la apolipoproteína E y glicolípidos (Ito *et al.*, 2002) y para determinar de Neu5Ac en preparados para lactantes en los cuales también se detecta la forma Neu5Gc, si bien su determinación no fue validada (Martín *et al.*, 2007). Recientemente Spichtig *et al.* (2010) han desarrollado un método en el que utilizan DMB para la determinación de Neu5Ac y Neu5Gc (incluida la validación de ambas formas de Sia) en leche y derivados lácteos en los que se incluyen los preparados infantiles.

También se han utilizado como agentes derivatizantes el cloruro de toluensulfonilo, derivados de benzoilo y la *O*-difenilendiamina. La derivatización con este último es más sencilla y rápida que con el DMB, y su determinación se puede hacer por ultravioleta o fluorescencia. A parte el OPD permite la determinación de Sia di y tri acetilado (Annumula, 1995).

En la actualidad los métodos que incluyen una derivatización previa son los más utilizados, ya que son más sensibles y selectivos que los espectrofotométricos. El problema de estos métodos es que son más caros y largos.

Por otra parte existen métodos de HPLC que acoplan sistemas de masas para la determinación de Sia en muestras biológicas. Se han descrito métodos de nano cromatografía líquida con detección de masas por transformada de Fourier, previa derivatización con DMB (Hashii et al., 2007). Aparte de esta técnica, también se utiliza la cromatografía líquida con ionización por electrospray con detección masas-masas (LC-ESI-MS/MS) (Shaw *et al.*, 2001; Valianpour *et al.*, 2004; Varki y Varki, 2007).

En los cuadros n° 3 y 4 se muestran las condiciones empleadas por distintos autores para la determinación del Sia por HPLC con detección ultravioleta-fluorescencia y masas, respectivamente.

En menor medida también se ha utilizado la cromatografía gaseosa acoplada a detección de masas (GC-MS), para la caracterización de las distintas formas del Sia y glicosiladas *O*-acetiladas. Zanetta *et al.* (2001) han desarrollado un método de GC-MS con ionización por impacto electrónico, previa derivatización con anhídrido heptafluorobutírico, para la

determinación de Sia en fluidos biológicos (suero equino y bovino, mucina salivar ovina y equina). El método permite diferenciar Neu5Ac, Neu5Gc, KDN, derivados 8-*O*-metilados y 8-*O*-sulfatados de estos, así como la forma Neu5Ac1,7lactona.

Para la detección de polímeros de siálico se utiliza la técnica de desorción de matriz asistida por láser – tiempo de vuelo con detección por masas (MALDI-TOF-MS). Esta técnica se ha utilizado para determinar los ácidos polisialícos de las cápsulas de *Neisseria meningitidis* NMC y *E. coli* K1 (Zhang et al., 2004). Se requiere una liberación con ácido trifluoroacético, derivatización y lactonización, previa al análisis de masas; se trata de un proceso largo, pero se consigue determinar la longitud de la cadena y el tipo de enlace con el que se unen los residuos de Sia ( $\alpha$  2-8 o 2-9).

Recientemente se ha desarrollado un método para la determinación de Sia en suero humano, mediante un biosensor amperométrico (Marzouk *et al.*, 2007). Este método permite la determinación de Sia libre sin pretratamiento, es económico, sensible (límite de detección 0,01mM) y reproducible (2,3% de coeficiente de variación (CV)). El problema es su corto intervalo de linealidad (0-3,5mM).

Por último, también se ha aplicado la técnica de electroforesis capilar a la determinación de Sia; la detección con masas permite cuantificar el Neu5Ac y Neu5Gc de suero humano (Ortner y Buchberger, 2008).

En la bibliografía existen revisiones que comparan los métodos descritos, como son las de Karamanos y Wikström (1990), Lamari y Karamanos (2002) y Rhorer (2002). El trabajo de revisión sobre métodos de

determinación de Sia y GG en muestras biológicas y productos lácteos, ha sido publicado recientemente (Lacomba *et al.*, 2010).

**Cuadro n° 2. Ácido siálico en muestras biológicas o productos lácteos: determinación espectrofotométrica.**

<b>Matriz</b>	<b>Análito</b>	<b>Pretratamiento</b>	<b>Determinación</b>	<b>Referencia</b>
Tejidos biológicos Leche y preparados infantiles	Neu5Ac	a) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50mM / 80°C / 60 min Neutralización con NaOH 1M	a) Periodato 10mM / 30 min / 37°C Disolución arsenito (2% v/v in 0,5 N HCl) / 3min Disolución TBA / 100°C / 7,5min	Aminoff (1961) Wang <i>et al.</i> (2001) Useh <i>et al.</i> (2008)
		b) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50mM / 80°C / 60 min	Enfriamiento 0°C / n-ButOH: 12N HCl (95:5 v/v) / 549nm	
		b) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50mM / 80°C / 60 min	b) Ácido bórico 0,2M (pH 8,5) / 100°C / 45 min / enfriamiento EtOH / reactivo Ehrlich t (p-dimetilamino benzaldehido en EtOH:HCl (1:1 v/v) / 70°C / 20min / 558nm	
		a) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1N ó HCl 0,1N / 80°C / 60 min	Periodato 10mM / 30 min / 37°C Disolución arsenito (2% v/v in 0,5 N HCl) / 3min Disolución TBA / 100°C / 7,5min Enfriamiento 0°C / n-ButOH: 12N HCl (95:5 v/v) / 549nm	Matoo <i>et al.</i> (1993)
		b) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1N ó HCl 0,1N / SDS 0,2% (w/v) / 85°C / 60 min	Periodato 10mM / 0°C / 45 min Tri sulfato sódico 50mM Acetato amónico 4M (pH 7,5) / acetamilida en EtOH 100mM / 10 min / $\lambda_{exc}$ : 471 nm, $\lambda_{em}$ : 388nm	Matsumo y Suzuki (2008)
		a) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50mM / 80°C / 60 min	Periodato 10mM / 0°C / 45 min Tri sulfato sódico 50mM Acetato amónico 4M (pH 7,5) / acetamilida en EtOH 100mM / 10 min / $\lambda_{exc}$ : 471 nm, $\lambda_{em}$ : 388nm	Matsumo y Suzuki (2008)
Fluidos biológicos	Sia T	Neuraminidasa / N-Acetylneuramincó-aldolasa / tampón fosfato 10mM (pH 6,8) / 45°C / 30min	Piruvato oxidasa / tampón fosfato (pH 7,4) / FAD / peroxidasa / 4-aminoantipiridina (pH 7,0) / EDTA 50mM en 0,1M fosfato disódico / 0,1M citrato sódico / Triton X-405 3g/L (pH 9,0) / 37°C / 15min / 550nm	Sugahara <i>et al.</i> (1980)

**Cuadro n° 2 (continuación). Ácido siálico en muestras biológicas o productos lácteos: determinación espectrofotométrica.**

<b>Matriz</b>	<b>Análito</b>	<b>Pretratamiento</b>	<b>Determinación</b>	<b>Referencia</b>
Tejidos y fluidos biológicos (leche)	Sia L Sia T	Sia T: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05N / 90°C / 60 min Dowex 2 x 8 (forma acetato)	Resorcinol (resorcinol disuelto en agua destilada, HCl Svennerholm concentrado, sulfato de cobre 0,1M) / 100°C / 15min / enfriar / (1958) alcohol amílico / agitación / 0°C / 15min / centrifugación / 450nm interferentes / 580nm ácido siálico	HCl Svennerholm (1958)
		Sia T : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1N / 80°C / 60 min Dowex 1x 8 (forma acetato)	Periodato ( periodate 0,2M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 9M) / agitación / 20 min / Warren (1959) disolución arsenito (arsenito sódico 10% w/v, sulfato sódico 0,05M, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1N) / agitación / disolución TBA (TBA 0,6% Carlson (1985) w/v, sulfato sódico 0,05M) / agitación / 100°C / 15 min / ciclohexanona (1:1 v/v) / centrifugación (3 min) 532 nm interferentes / 549 nm ácido siálico	Warren (1959) Carlson (1985)
		Sia T : Neuraminidasa / 37°C / 180 min	Kit comercial: Tampón Tris (pH 7.5) / Neu5Ac aldolasa / 37°C / Crook <i>et al.</i> (1993) 10min / NADH / 340nm (blanco) Lactato deshidrogenasa / 37°C / 10min / 340nm (ácido siálico)	Crook <i>et al.</i> (1993)
Leche Preparados infantiles Sueros lácteos	Sia L Sia T	Sia T: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5N / 80°C / 60 min	Ácido periódico 0,04 M / 0°C / 20min / resorcinol / 0°C / 5 min / 100°C / 15 min / Tert-ButOH / 37°C / 3 min / centrifugación 630 nm	Neeser <i>et al.</i> (1991) Uemura <i>et al.</i> (2006)
Leche Preparados infantiles	Sia L Sia T	Sia T: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,12N / 80°C / 60 min Dowex 2x8 (forma formiato) Liofilización	Reconstitución en agua / resorcinol / 100°C / 15 min / ButOH:Acetato terbutilo / 0°C / 15 min / centrifugación 450 nm interferentes / 580 nm	Puente <i>et al.</i> (1992) Sánchez-Díaz <i>et al.</i> (1997) Martín-Sosa <i>et al.</i> (2003, 2004)

ButOH, butanol; EDTA, ácido etilenediaminotetraacético; FAD, flavin adenin dimucleótido; SDS dodecil sulfato sódico; Sia L, ácido siálico libre; Sia T, ácido siálico total; TBA, ácido tiobarbitúrico.

**Cuadro n° 3.** Ácido siálico en muestras biológicas o productos lácteos: determinación por HPLC.

Matriz	Analito	Pretratamiento	Derivatización Reactivos/Condiciones	Columnas y parámetros HPLC	Referencias
Tejidos biológicos	Neu5Ac	NaHSO <sub>4</sub> 0,5M / 80°C / 20 min / enfriamiento	Reactivo OPD (OPD 20 mg / mL en 0,25M NaHSO <sub>4</sub> ) / 80°C / 40min / enfriamiento	Ultrasphere-ODS RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) 1-butilamina:ácido fosfórico :THF:agua (0,15:0,5: 1:98,8) (A): A:AcN (50:50) 87:13 1mL / min. v.i.20 µL 230 / 425 nm.	Annumula (1995)
	Neu5Gc	HCl ó TFA 25mM / 80°C / 120 min Liofilización	Mezcla de benzoilización (anhidrido benzoico 10% p/v, p-dimetilaminopiridina 5% p/v) / 80°C / 20min / agua / 80°C / 10 min / Sep-Pack C <sub>18</sub> Evaporación / AcN / centrifugación	Supelcosil LC-18 (250 x 4,5 mm, 5 µm). Precolumna Brownlee RP-C18 (5µm). Agua:AcN 33:67.1.5 mL / min v.i. 20 µL / 231 nm	Karamanos y Wikström (1990)
Fluidos biológicos	Neu5Ac	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05M / 80°C / 60 min Sep-Pack Plus C <sub>18</sub> / HVLP 0,45 µm		LiChrosphere RP-C18 (250 x 4 mm, 10 µm). TIP <sub>ac</sub> 60mM (pH 3,5) 0,6mL/min. V.i. 20 µL. 215 nm (Neu5Ac)	Siskos y Spyridiaki (1999)
	Neu5Ac2en	HVLP 0,45 µm		240 nm (Neu5Ac2en)	
	Neu5AcNeu5Gc	TFA 2M / 80°C / 120 min Liofilización / Dowex 50 x 8 (forma sulfito) / liofilización	Tos-Cl / 60°C / 40 min / sequedad / redisolución MetOH:agua (1:8) / Sep-Pack C <sub>18</sub> / evaporación / AcN	Supelcosil LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). Precolumna Brownlee RP-C18 (5µm). Agua:AcN 85:15. 1 mL / min. v.i. 50 µL. 231 nm	Makatsori <i>et al.</i> (1998)

**Cuadro n° 3 (continuación). Ácido siálico en muestras biológicas o productos lácteos: determinación por HPLC.**

Matriz	Analito	Pretratamiento	Derivatización Reactivos/Condiciones	Columnas y parámetros HPLC	Referencias
Tejidos y fluidos biológicos	Neu5Ac	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,025M / 80°C / 60 min	DMB 7mM (DMB dihidrocloruro en β-mercaptopoetanol 1 M, hidrosulfito sódico 18mM) / 60°C / 150 min	Radial-Pak C18 (100 x 8 mm, 5 μm). MetOH:AcN:agua 25:4:91. 1,2 mL / min. v.i. 10 μL. 373 / 448 nm	Hara <i>et al.</i> (1987)
	Neu5Gc			Supelco RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm). Precolumna Supelguard LC-18 (5 μm). Agua (pH 3,0 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ):MetOH:AcN 86:6:8. 1 mL / min. v.i. 50 μL. 373 / 448 nm	Lagana <i>et al.</i> (1993)
Preparados infantiles	Neu5Ac	CH <sub>3</sub> COOH 2M / microondas 200W / 10 min	DMB 7 mM (DMB dihidrocloruro en β-mercaptopoetanol 0,75 M, hidrosulfito sódico 18mM, ácido acético 1,4 M) / 50°C / 150 min	LiChrosorb RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm). Precolumna LiChrosorb RP-C18 (5 μm). MetOH:AcN:Agua 7:8:85 0,9 mL / min. v.i. 20μL. 373 / 448 nm	Martín <i>et al.</i> (2007)
	Neu5Gc	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05M / 80°C / 60 min Dowex 2 x 8 (formiato) / ultracentrifugación Microcon-YM10	DMB 8 mM (DMB dihidrocloruro en β-mercaptopoetanol 0,8M, hidrosulfito sódico 14mM, ácido acético 1,5 M) / 50°C / 150 min	Zorbax SB-Aq (50 x 4,6 mm, 3,5 μm). MetOH:Agua:Acético 75:25:0,05 1 mL/min. v.i. 10 μl. 373/448 nm	Spiching <i>et al.</i> (2010)
Leche, derivados lácteos y preparados infantiles	Neu5Ac Neu5Gc	HCOOH 0,5M / 80°C / 120 min Ultracentrifugación MC Biomax-30	DMB 7 mM (DMB dihidrocloruro en β-mercaptopoetanol 0,75 M, hidrosulfito sódico 18mM, ácido acético 1,4 M) / 80°C / 50 min		

AcN, acetnitrilo; DMB, 1,2-diamino-4,5-metilenedioxi-benzeno; HVLFP, filtrado a baja presión de altos volúmenes; MetOH (Methanol); OPD, O-fenilenediamina; TFA, ácido trifluoroacético; THF, tetrahidrofurano; TIP, trisopropanolamina; Tos-Cl, cloruro de p-tolueno sulfonilo; v.i., volumen de inyección

**Cuadro n° 4.** Ácido siálico en muestras biológicas o productos lácteos: determinación por HPLC-MS.

Matriz	Análito	Pretratamiento	Parámetros HPLC	Condiciones MS	Referencia
Tejidos biológicos	Neu5Ac	Extracción por centrifugación (100 000xg / 4°C / 60 min)	Magic C18 (50 x 0,1 mm, 3 µm).	NanolC / FTMS: 200°C. Voltaje de spray 1800 eV. AGC 5 x 10 <sup>4</sup> .	Hashii <i>et al.</i> (2007)
	Neu5Gc	Ácido acético 4M / 80°C / 180 min Sep-Pack C <sub>18</sub> DMB (kit comercial)	Ácido fórmico:AcN:agua (0,1:2:97,9) ; Ácido fórmico:AcN:agua (0,1:80:19,9) Gradiente elución : 0-0,1 min 90:10, 0,1-30 min 10:90. 0,75 µL / min	SIM: Neu5Ac - DMB m/z 426,150 Neu5Gc - DMB m/z 442,145	
Fluidos biológicos	Neu5Ac	HCl 0,01M / 80°C / 60 min	Ultra IBD (150 x 4,6 mm, 5 µm)	LC / ESI / MS: Modo positivo. Gas transportador N <sub>2</sub> 440 L / h.	Shaw <i>et al.</i> (2001)
	Neu5Gc	Adición de patrón interno (Ester metílico de Neu5Ac)	Ácido fórmico 0,1%, 0,5 mL / min. v.i. 10 µL	180°C. 19 V Voltaje capilar 3,5 kV SIM: Neu5Ac m/z 310; ester metílico Neu5Ac m/z 324; Neu5Gc m/z 326	
<hr/>					
Neu5Ac					
		Adición de patrón interno (KDN)	LiChrosphere amino propilo (20 x 2 mm, 5 µm).	LC / ESI / MS / MS: Modo negativo. Gas Nebulizador N <sub>2</sub> . Gas de colisión Ar (0,25 Pa) 80°C. 20 V. Voltaje capilar 3 kV.	Valianpour <i>et al.</i> (2004)
			Amoniaco 0,114 g / L; AcN.	MRM: Neu5Ac m/z 308,3 → m/z 86,9; KDN m/z 267,2 → m/z 86,9	
			Gradiente elución : 0-2 min 0:100, 2-2,5 min 90:10, 2,5-6 min 90:10, 6-6,1 min 0:100, 6,1-10 min 90:10. 0,3 mL / min. v.i. 10 µL	Adquisición: 4-8 min HPLC. v.i. 30 µL	
<hr/>					
Sia L					
		Adición de patrón interno ( <sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Neu5Ac)	Atlantis dC18 (20 x 3 mm, 3 µm).	LC/ESI/MS/MS: Modo negativo. Gas nebulizador N <sub>2</sub> 100 L / h. Gas colisión Ar (0,003 mbar). 300°C 35 V. Voltaje capilar 3,2 kV	Varki y Varki (2007)
Sia T		SL: Filtración (0,20 µm) ST: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,063M / 80°C / 60 min	Precolumna Atlantis dC18 (100 x 3 mm, 3 µm). Formiato amónico 0,05M (pH 3,0): AcN. Gradiente elución : 0-2 min 0:100, 2-2,5 min 0:100, 2,5-2,8 min 100:0, 2,8-6 min 100:0, 6,1-10 min 90:10. 0,3 mL / min. v.i. 10 µL	MRM: Neu5Ac m/z 308,2 → m/z 87,0; <sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Neu5Ac m/z 311,2 → m/z 90,0	
Adquisición : 2-3,7 min HPLC					

AcN, acetónitrilo; AGC, control de ganancia automática; DMB, 1,2-diamino-4,5-Metilenedioxiibenzeno; ESI, ionización por electrospray; FTSM, espectroscopía de masas con transformada de Fourier; KDN, ácido 2-ceto-3-deoxi-D-glicero-D-galactonónico; MALDI, ionización por desorción asistida por láser en matriz; MeOH, metanol; MRM, control múltiple de reacción, SIM, control por selección de iones; SL, ácido siálico libre; ST, ácido siálico total; TFA, ácido trifluoroacético; TOF, tiempo de vuelo; v.i., volumen de inyección.

## 2.5 Contenidos en leche y preparados infantiles

Son escasos los estudios sobre el contenido de Sia en alimentos. La mayoría se realizan en leche de distintas especies, así como en productos destinados a la alimentación infantil, ya que a pesar de poder ser sintetizado *de novo*, el Sia aportado con la alimentación es muy importante en los recién nacidos, debido a que los enzimas encargados de su síntesis presentan una actividad muy baja (Wang y Brand-Miller, 2003).

En el cuadro nº 5 se muestra una recopilación, de los contenidos de Sia total, unido a proteínas y glúcidos, en LH.

El mayor contenido de Sia total en LH corresponde al calostro (1781,6-1320,7 mg/L) y va disminuyendo conforme avanza el tiempo de lactación. Estas variaciones aun no han sido explicadas (Wang *et al.*, 2001), si bien podrían atribuirse al incremento en la capacidad de los recién nacidos de sintetizar el Sia *de novo*, con el crecimiento (Wang, 2009). Las diferencias observadas entre distintos autores se atribuyen a condiciones genéticas, geográficas y dietéticas, así como a los métodos de determinación (Wang, 2009).

Wang *et al.* (2001), encuentran mayores contenidos en LH de madres de niños pretérmino, respecto a la de madres de niños a término, igualándose éstos a partir de los tres meses de lactación. Los autores indican que estas diferencias entre ambos grupos podrían deberse a la gran variabilidad individual que presenta cada muestra, y al poco número de muestras analizadas.

**Cuadro n° 5.** Contenidos (expresados en mg Neu5Ac/L) de ácido siálico total, siálico unido a proteínas y glúcidos en leche humana.

<b>Periodo lactación (semana)</b>	<b>N° voluntarias</b>	<b>Sia total</b>	<b>Sia-Proteínas</b>	<b>Sia-Glúcidos</b>	<b>Referencia</b>
0-2	47 (USA)	--	267,0	1138,0	Carlson (1985)
2-4		--	192,0	706,0	
4-6		--	133,0	348,0	
6-8		--	116,0	258,0	
10-28		--	73,0	135,0	
4-14*	1 (Suiza)	933,0	--	--	Neeser <i>et al.</i> (1991)
16		280,4	--	--	
Calostro	20 (niños a término)	1546,4	346,9	1150,5	Wang <i>et al.</i> (2001)
Transición		1070,1	225,8	816,4	
4		612,4	133,0	457,7	
12	14 (niños pre-término)	321,7	89,7	225,8	(Australia)
Calostro		1781,6	402,9	1320,7	
Transición		1320,7	312,4	977,9	
4		791,8	179,4	584,6	
12		402,9	114,4	281,5	
1-4*	12 mujeres (España)	--	--	1018,0	Martín-Sosa <i>et al.</i> (2003)
2		--	--	696,0	
4		--	--	365,0	
1-4*	12 mujeres (España)	1277,0	149,1	1063,7	Martín-Sosa <i>et al.</i> (2004)
2		910,8	108,2	720,6	
4		525,8	78,2	411,2	

\*Días

El Sia en la LH se encuentra fundamentalmente unido a glúcidos (fracción de oligosacáridos), suponiendo un 70-80% del total, mientras que la fracción unida a lípidos y libre, únicamente supone un 3-5% del total (Wang *et al.*, 2001; Martín-Sosa *et al.*, 2004).

En el cuadro nº 6 se recogen los contenidos de Sia total, unido a proteínas y glúcidos de distintos mamíferos.

Al igual que en LH se observa un descenso en la cantidad total de Sia desde el calostro a leche madura (Puente *et al.*, 1994 y 1996; Useh *et al.*, 2008) independientemente de la especie considerada. En los estudios en los que se comparan los contenidos de Sia en LH y leche de vaca, se observa un mayor contenido en LH (Neeser *et al.*, 1991; Martín-Sosa *et al.*, 2003).

La distribución del Sia entre las distintas fracciones es del 90% en la fracción proteica y 10% en la glucídica (Carlson, 1985).

Entre los estudios con leche de otros mamíferos debe destacarse el realizado por Neeser *et al.* (1991), en donde observan que el tratamiento térmico (pasteurizada y UHT) no afecta al contenido total de Sia. Además de las diferencias en Sia entre especies, los autores destacan la gran variabilidad en una especie inducidos por factores ambientales y nutricionales.

En el cuadro nº 7 se recogen los contenidos de Sia total, unido a proteínas y glúcidos de preparados infantiles.

**Cuadro nº 6.** Contenidos (expresados en mg Neu5Ac/L) de ácido siálico total, siálico unido a proteínas y glúcidos en leche de otros mamíferos.

<b>Descripción muestra</b>	<b>Periodo lactación*</b>	<b>Sia</b>	<b>Referencia</b>
Vaca – Fresca	Madura	146,0 <sup>a</sup> /14,0 <sup>b</sup>	Carlson (1985)
– Fresca		168,0	Neeser <i>et al.</i> (1991)
– Pasteurizada		192,2	
– UHT		194,4	
– Fresca		54,0-69,0	Puente <i>et al.</i> (1996)
– Fresca	2	231,0 <sup>b</sup>	Martín-Sosa <i>et al.</i> (2003)
	7	38,0 <sup>b</sup>	
	72	33,0 <sup>b</sup>	
	240	54,0 <sup>b</sup>	
– Fresca	Madura	217,9	Martín <i>et al.</i> (2007)
– Pasteurizada	Madura	196,7 <sup>c</sup>	Spichtig <i>et al.</i> (2010)
Cabra – Fresca	1	1147,0	Puente <i>et al.</i> (1994)
	2	558,0	
	8	231,0	
	15	183,0	
	60	203,0	
– Fresca	Madura	229,0-242,0	Puente <i>et al.</i> (1996)
– Fresca	Calostro	193,3	Useh <i>et al.</i> (2008)
	Madura	112,5	
– Pasteurizada	Madura	177,7 <sup>c</sup>	Spichtig <i>et al.</i> (2010)
Elefanta – Fresca	11	300,0	Uemura <i>et al.</i> (2006)
Zebú – Fresca	Calostro	220,0	Useh <i>et al.</i> (2008)
	Madura	171,3	
Oveja – Fresca	Calostro	302,9	Puente <i>et al.</i> (1995)
	Madura	96,8	
– Fresca	1	632,1	
	2	422,4	
	4	365,6	
	8	201,2	
	15	176,4	
	30	209,2	
– Pasteurizada	Madura	244,1 <sup>c</sup>	Spichtig <i>et al.</i> (2010)

<sup>a</sup>Sia unido a proteínas, <sup>b</sup>Sia unido a glúcidos, <sup>c</sup>Sia total como suma de Neu5Ac y Neu5Gc

\*Días

**Cuadro n° 7.** Contenidos (expresados en mg Neu5Ac/L) de ácido siálico total, siálico unido a proteínas y glúcidos en preparados para lactantes (PL) y de continuación (PC).

<b>Periodo lactación</b>	<b>Caseína /Suero</b>	<b>Sia total</b>	<b>Sia-Proteínas</b>	<b>Sia-Glúcidos</b>	<b>Referencia</b>
PL y PC	40/60 82/18	-- --	67 56	72 14	Carlson (1985)
PL y PC	100/0 82/18 40/60	92,0 104,6 172,2-208,4	-- -- --	-- -- --	Neeser <i>et al.</i> (1991)
Hidrolizado	0/100	256,2-287,6	--	--	
PL PC	40/60 --	233,0-266,0 150,0-240,0	52,8-83,9 72,4-98,3	116,0-174,0 106,3-135,6	Sánchez-Díaz <i>et al.</i> (1997)
PL PL PC Pt* Psj*	40/60 80/20 -- 22:78 --	114,4 64,9 133,0 194,8 15,5	83,5 49,5 98,9 111,3 15,5	30,9 15,5 34,0 80,4 0	Wang <i>et al.</i> (2001)
PL	--	--	--	38,0	Martín-Sosa <i>et al.</i> (2003)
PL PC Psj	--	115,1-157,3 107,8-166,0 0	-- -- --	-- -- --	Martín <i>et al.</i> (2007)
PL, PC y leche de crecimiento	--	141,7-339,3	--	--	Spichtig <i>et al.</i> (2010)

\*Pt, preparado pre-término; Psj, preparado a base de leche de soja

En los preparados infantiles (ver cuadro n° 7), se observa que los contenidos en Sia están comprendidos en un amplio intervalo. El contenido más alto corresponde a un preparado infantil elaborado con calostro bovino (Spichtig *et al.*, 2010).

En general los contenidos de Sia total en los preparados infantiles guardan una relación directa con la proporción caseína/suero. Así las muestras hipoalergénicas a base de hidrolizados (0/100) son las que contiene mayor cantidad de Sia (Neeser *et al.*, 1991). Este mismo hecho es corroborado por los estudios de Carlson (1985) y de Wang *et al.* (2001). En este mismo sentido, Sánchez-Díaz *et al.* (1997) indican que aquellos preparados a los que se les han adicionado suero en polvo desmineralizado para disminuir la relación caseína/suero, tienen mayor contenido en Sia.

En cuanto a los preparados elaborados a partir de leche de soja, cabría esperar que no hubiese Sia, ya que estos compuestos no se encuentran en plantas. Mientras que Martín *et al.* (2007) por HPLC-fluorescencia confirman este hecho, Wang *et al.* (2001) si que encuentran 15,5 mg Sia total/L, en preparados de este tipo, si bien ellos mismos indican que la presencia de Sia puede ser debida a un error experimental, ya que con el método del resorcinol (utilizado por ellos), no se diferencia el ácido siálico del ácido quínico y otros similares presentes en plantas.

La distribución en las fracciones proteicas y glucídicas es heterogénea entre los distintos autores (22-76% sialo-proteínas, 24-70% sialo-oligosacáridos), si bien ambas constituyen la práctica totalidad del Sia (94-98% del total), quedando únicamente una pequeña parte de Sia unido a lípidos o libre.

Los mayores contenidos de Sia total se dan en el calostro humano, que al ser mayor que los de la leche de vaca, utilizada para elaborar preparados infantiles, hace que estos preparados presenten contenidos inferiores al calostro humano, aunque pueden llegar a equipararse a la LH madura

(Carlson *et al.*, 1985; Neeser *et al.*, 1991; Sánchez-Díaz *et al.*, 1997; Martín-Sosa *et al.*, 2003).

Existen pocos estudios que diferencien entre los contenidos de Neu5Ac y/o Neu5Gc. Martín-Sosa *et al.* (2004) confirman la ausencia de Neu5Gc en LH. En leche de vaca Tang *et al.* (2008) obtienen contenidos de 12,11 – 24,87 Neu5Ac/L y 0,18 – 6,51 mg Neu5Gc/L determinados por cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico con detección amperométrica. Puente *et al.* (1992) estiman por densitometría óptica que el porcentaje de Neu5Gc es del 6,5%. Recientemente, Spichtig *et al.* (2010) determinan que el mayor contenido de Neu5Ac se da en leche de vaca (191,9 mg/L), seguida de la de cabra con 76,2 mg/L y la de oveja con 19,7 mg/L; en cuanto al Neu5Gc, ésta es la forma mayoritaria en leche de oveja (224,5 mg/L) y cabra (100,6 mg/L), mientras que en la leche de vaca su presencia es minoritaria (5,3 mg/L). Con lo que el porcentaje de Neu5Gc respecto al Sia total es de un 2,7, 92,0 y 56,8 para leche de vaca, oveja y cabra, respectivamente.

En preparados infantiles, únicamente se conocen los contenidos de Neu5Ac y Neu5Gc obtenidos, mediante HPLC-fluorescencia, por Martín *et al.* (2007) (107,8 – 166,0 mg Neu5Ac/L) y Spichtig *et al.* (2010) (119,6 – 325,0 mg Neu5Ac/L y 4,8 – 14,3 mg Neu5Gc/L). En todos los casos, el Neu5Gc no supera el 4,6% del Sia total.

### 3. Gangliósidos

#### 3.1 Estructura y nomenclatura

Los GG son glicoesfingolípidos ácidos que contienen en su estructura al menos un residuo de Sia (Cabezas *et al.*, 1989).

Los glicoesfingolípidos fueron descubiertos por Thudichum en 1884 mientras estudiaba la composición del cerebro (Wennekes *et al.*, 2009). Se trata de compuestos formados por al menos un monosacárido y una ceramida. Esta última está compuesta por una cadena amino-alcohol (base esfingoide) de unos 16 a 20 carbonos (18 en mamíferos), en la que se pueden encontrar grupos hidroxilo y alguna insaturación. La ceramida se forma al unirse la base esfingoide, mediante un enlace amida, a un ácido graso (propio de cada especie) (Vesper *et al.*, 1999).

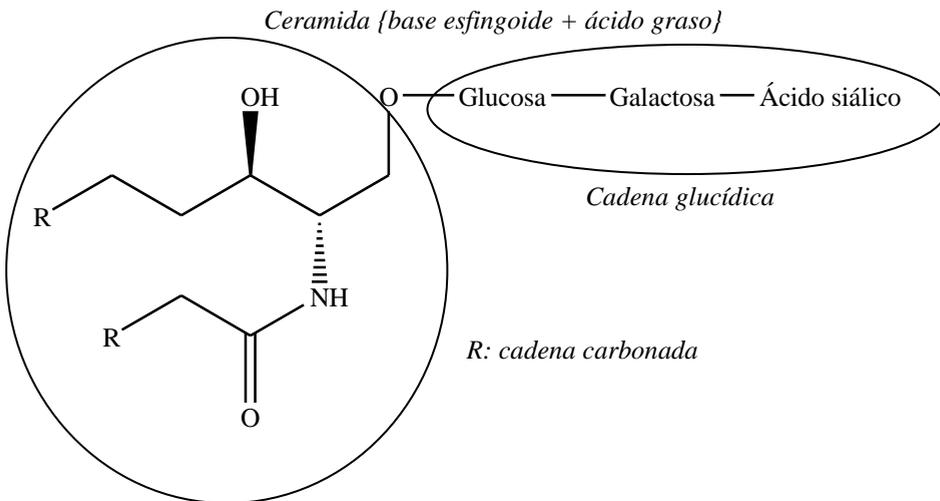
El grupo alcohol primario de la ceramida puede formar un éster con el ácido fosfórico (ceramida 1-fosfato), a su vez, el fosfórico puede unirse a una colina (esfingomielina); cuando la ceramida se une a un glúcido se obtiene un glicoesfingolípidos. En los animales, este glúcido puede ser la glucosa o la galactosa, generando glucosilceramida (GlcCer) o galactosilceramida (GalCer), respectivamente. En el caso de la glucosa pueden establecerse otros enlaces glucosídicos; en general se une a una galactosa, generando lactosilceramida (LacCer) y sobre ésta otros compuestos, que dan lugar a distintas series de glicoesfingolípidos (lacto, neolacto, muco, globo, isoglobo y ganglio) (ver figura nº 6). En función del tipo de glúcidos se diferencia entre glicoesfingolípidos neutros (monosacáridos sin carga) o ácidos (sulfátidos – azúcares sulfatados,

fosfoglicoesfingolípidos – fosfodiester, o gangliósidos – ácido siálico) (Zancada, 2008).

Gal	$\xrightarrow{\beta}$	3GlcNAc	$\xrightarrow{\beta}$	3Gal	$\xrightarrow{\beta}$	4Glc	$\xrightarrow{\beta}$	1' Cer	<i>Lacto</i>
Gal	$\xrightarrow{\beta}$	4GlcNAc	$\xrightarrow{\beta}$	3Gal	$\xrightarrow{\beta}$	4Glc	$\xrightarrow{\beta}$	1' Cer	<i>Neolacto</i>
Gal	$\xrightarrow{\beta}$	3Gal	$\xrightarrow{\beta}$	4Gal	$\xrightarrow{\beta}$	4Glc	$\xrightarrow{\beta}$	1' Cer	<i>Muco</i>
GalNAc	$\xrightarrow{\beta}$	3Gal	$\xrightarrow{\alpha}$	4Gal	$\xrightarrow{\beta}$	4Glc	$\xrightarrow{\beta}$	1' Cer	<i>Globo</i>
GalNAc	$\xrightarrow{\beta}$	3Gal	$\xrightarrow{\alpha}$	3Gal	$\xrightarrow{\beta}$	4Glc	$\xrightarrow{\beta}$	1' Cer	<i>Isoglobo</i>
Gal	$\xrightarrow{\beta}$	3GalNAc	$\xrightarrow{\beta}$	4Gal	$\xrightarrow{\beta}$	4Glc	$\xrightarrow{\beta}$	1' Cer	<i>Ganglio</i>

**Figura nº 6.** Series de glicosfingolípidos en función de su cadena glucídica. Cer, ceramida; Gal, galactosa; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina. Adaptado de Zancada (2008).

Los GG son glicoesfingolípidos ácidos, de carácter anfipático (la parte hidrofóbica es la ceramida, y la hidrofílica es la glucídica) (ver figura nº 7).



**Figura nº 7.** Estructura del gangliósido GM<sub>3</sub>.

La ceramida presenta una gran variabilidad en su composición ya que, para una misma especie, tanto la base esfingoide como el ácido graso pueden ser distintos. La cadena glucídica puede presentar la secuencia completa, o parcial, de monosacáridos que se muestran en la figura nº 6 (se van perdiendo desde el extremo opuesto a la ceramida). Sobre cada uno de los monosacáridos puede unirse uno o varios residuos de Sia en sus diversas estructuras.

Al ser un grupo tan heterogéneo de compuestos su nomenclatura es compleja. Existen dos formas de nombrar a los GG, una común, poco precisa, propuesta por Svennerholm (1963) y otra más precisa propuesta por la IUPAC (1997). En ambos casos, para simplificar la nomenclatura, no se tiene en cuenta la composición de la ceramida.

En la nomenclatura de Svennerholm se utiliza un código alfanumérico de tres o cuatro caracteres (ver cuadro nº 8). Todos comienzan con la letra G, para indicar que se trata de un gangliósido. A continuación se indica con las letras M, D, T o Q el número de residuos de Sia, según sean uno, dos, tres ó cuatro, respectivamente. Con un número, se indica la longitud de la cadena glucídica: 1– cuatro monosacáridos (cadena completa, ver figura nº 6), 2 – falta galactosa, 3 – falta galactosa y *N*-acetilgalactosamina y 4 – sólo tiene glucosa. Finalmente, en los GG en los que el Sia puede estar en más de una posición, se coloca una letra minúscula (a, b o c) que indica donde se sitúa (Svennerholm, 1963).

Según el método de la IUPAC, comenzando de derecha a izquierda, se nombra la ceramida de modo genérico como “cer”, seguido del símbolo “Gg”, que define la serie ganglio, con un subíndice que indica la longitud de

la cadena glucídica, pero en este caso el 1 indica que sólo está presente la glucosa, 2 – glucosa y galactosa, 3 – glucosa, galactosa y *N*-acetilgalactosamina, y el 4 que está la cadena completa. A continuación se nombra el Sia, haciendo referencia a la estructura de este (Neu5Ac, Neu5Gc, etc.), con un subíndice que indica el número de los mismos presentes en la estructura, y precedido por el tipo de enlace con el que se une a la cadena glucídica ( $\alpha$  o  $\beta$ ). Por último, con números romanos se indica la localización del Sia en la cadena glucídica (I – Glc, II – Gal, III–GalNac, IV – Gal terminal, V unido al primer residuo de Sia, VI al segundo, etc.), y con un superíndice el átomo de carbono implicado en la unión. (IUPAC, 1997). En el cuadro nº 8 se muestran varios ejemplos de ambas nomenclaturas.

**Cuadro nº 8.** Nomenclatura y estructura de algunos gangliósidos.

<b>Svenherholm</b>	<b>IUPAC</b>	<b>Estructura</b>
GM <sub>3</sub>	II <sup>3</sup> - $\alpha$ -Neu5Ac-Gg <sub>2</sub> Cer II <sup>3</sup> - $\alpha$ -Neu5Gc-Gg <sub>2</sub> Cer	Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer Neu5Gc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer
GM <sub>2</sub>	II <sup>3</sup> - $\alpha$ -Neu5Ac-Gg <sub>3</sub> Cer	GalNac $\beta$ 1,4(Neu5Ac $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4GlcCer
GM <sub>1</sub>	II <sup>3</sup> - $\alpha$ -Neu5Ac-Gg <sub>4</sub> Cer	Gal $\beta$ 1,3GalNac $\beta$ 1,4(Neu5Ac $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer
GD <sub>3</sub>	II <sup>3</sup> ,V <sup>8</sup> - $\alpha$ -Neu5Ac <sub>2</sub> -Gg <sub>2</sub> Cer II <sup>3</sup> - $\alpha$ -Neu5Ac-V <sup>8</sup> -Neu5Gc-Gg <sub>2</sub> Cer II <sup>3</sup> ,V <sup>8</sup> - $\alpha$ -Neu5Gc <sub>2</sub> -Gg <sub>2</sub> Cer	Neu5Ac $\alpha$ 2,8Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer Neu5Gc $\alpha$ 2,8Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer Neu5Gc $\alpha$ 2,8Neu5Gc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer
GT <sub>3</sub>	II <sup>3</sup> ,V <sup>3</sup> ,VI <sup>3</sup> - $\alpha$ -Neu5Ac <sub>3</sub> -Gg <sub>2</sub> Cer	Neu5Ac $\alpha$ 2,8Neu5Ac $\alpha$ 2,8Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer
GT <sub>1a</sub>	II <sup>3</sup> ,IV <sup>3</sup> ,VI <sup>8</sup> - $\alpha$ -Neu5Ac <sub>3</sub> -Gg <sub>4</sub> Cer	Neu5Ac $\alpha$ 2,8Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNac $\beta$ 1,4(Neu5Ac $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer
GT <sub>1b</sub>	II <sup>3</sup> ,IV <sup>3</sup> ,V <sup>8</sup> - $\alpha$ -Neu5Ac <sub>3</sub> -Gg <sub>4</sub> Cer	Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNac $\beta$ 1,4(Neu5Ac $\alpha$ 2,8Neu5Ac $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer

**Cuadro n° 8 (continuación).** Nomenclatura y estructura de algunos gangliósidos.

Svenherholm	IUPAC	Estructura
GT <sub>1c</sub>	II <sup>3</sup> ,V <sup>3</sup> ,VI <sup>3</sup> -α-Neu5Ac <sub>3</sub> -Gg <sub>4</sub> Cer	Galβ1,3GalNAcβ1,4(Neu5Acα2,8Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3)Galβ1,4Glc-Cer
GQ <sub>1b</sub>	II <sup>3</sup> ,VI <sup>3</sup> ,V <sup>3</sup> ,VII <sup>8</sup> -α-Neu5Ac <sub>4</sub> -Gg <sub>4</sub> Cer	Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAcβ1,4(Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3)Galβ1,4Glc-Cer

### 3.2 Presencia y distribución en organismos vivos

Los GG se distribuyen de forma heterogénea entre distintas especies de vertebrados superiores (Svennerholm *et al.*, 1989). En el cuadro n° 9 se recopilan la distribución y concentraciones de los GG en el ser humano.

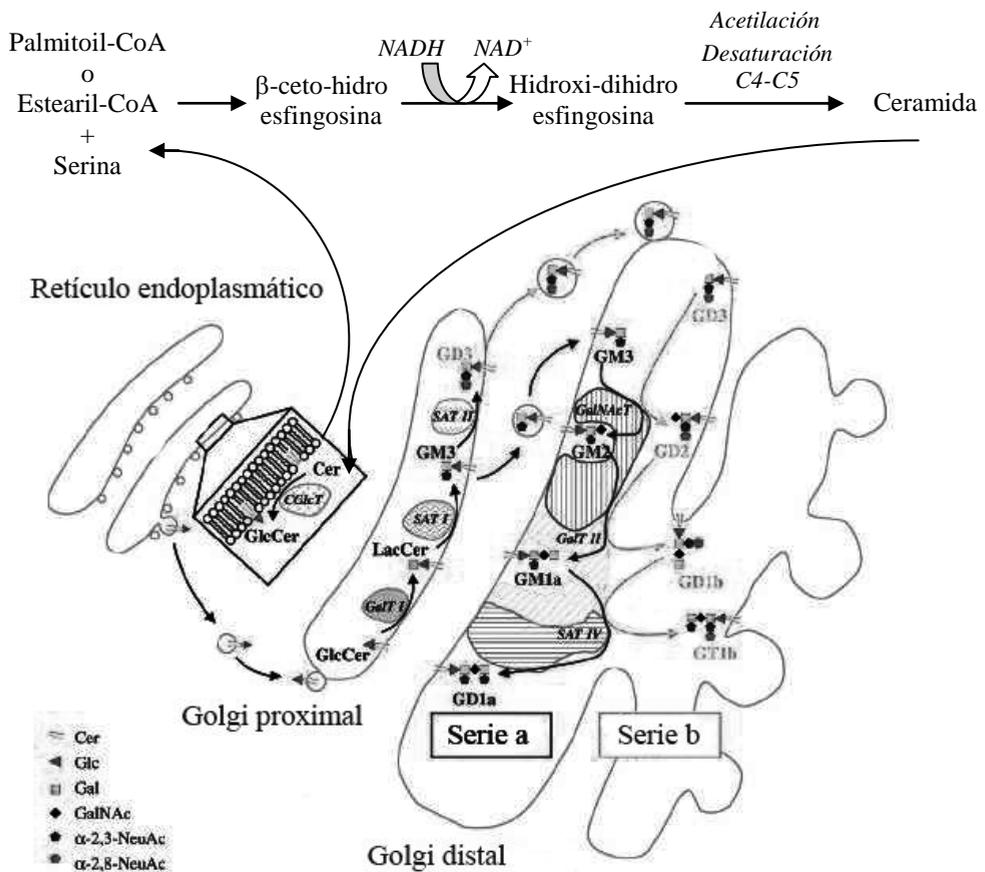
**Cuadro n° 9.** Distribución y concentraciones de los gangliósidos en el ser humano.

Tejido	GG <sub>T</sub>	GG <sub>I</sub> (%)	Autor
Plasma	3,5 mg/L	--	Yu y Ledeen, 1972
Pulmones	0,5 mg/g proteína	GM <sub>3</sub> (58); GM <sub>2</sub> +GM <sub>1</sub> (22); GD <sub>1a</sub> a GT <sub>3</sub> (20)	Narasimhan y Murray, 1979
Líquido amniótico	0,15 mg/L	GM <sub>3</sub> y GD <sub>3</sub> (mayoritarios)	Rueda <i>et al.</i> , 1993
Intestino:			
-Ileon	43,3 mg/g ms	GM <sub>3</sub> y GD <sub>3</sub> (mayoritarios)	Holgerson <i>et al.</i> , 1988
-Colon	40,2-20,1 mg/g ms	--	
Cerebro:			
-Materia gris	0,3 mg/g mh	GM <sub>1</sub> (15); GD <sub>1a</sub> (21); GD <sub>1b</sub> (18); GT <sub>1b</sub> (16)	Wang, 2009
-Materia blanca	0,9 mg/g mh	GM <sub>1</sub> (22); GD <sub>1a</sub> (9); GD <sub>1b</sub> (17); GT <sub>1b</sub> (11)	
Riñones	2,0 µg/g mh	GM <sub>3</sub> y GM <sub>1</sub> (mayoritarios) GD <sub>3</sub> y GD <sub>1a</sub> (trazas)	Rauvala, 1976

GG<sub>I</sub>, gangliósidos individuales; GG<sub>T</sub>, gangliósidos totales; mh, materia húmeda; ms, materia seca.

En el ser humano se localizan fundamentalmente, en el tejido neuronal, formando parte de las membranas (6-10% (p/p) del total de lípidos cerebrales (Tettamanti *et al.*, 1973). También se encuentran en membranas de tejidos extraneurales y fluidos biológicos.

En la figura nº 8, a modo de ejemplo, se muestra un diagrama propuesto por Echten-Deckert y Hergert (2006) para la síntesis de los GG de las series a y b.

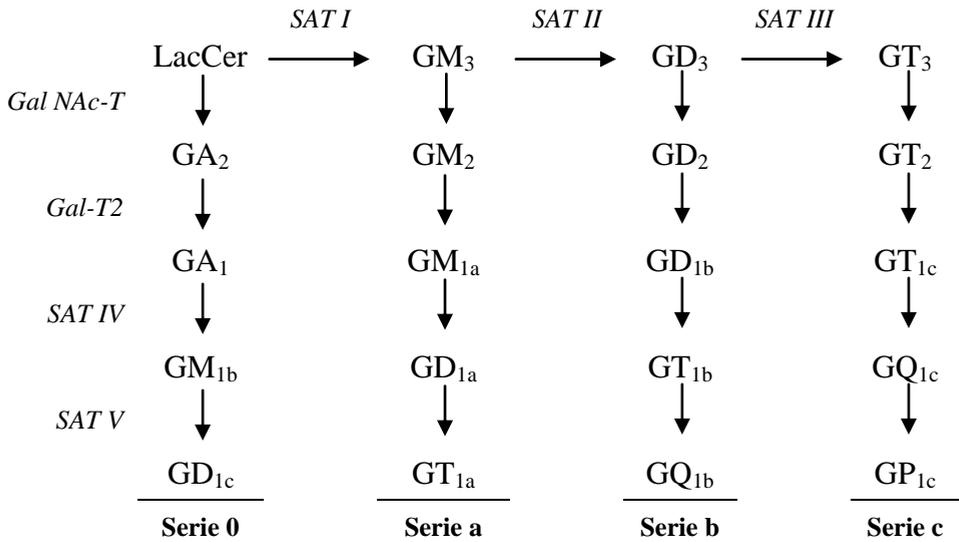


**Figura nº8.** Síntesis de gangliósidos de la serie a y b (Echten-Deckert y Hergert, 2006).

La síntesis *de novo* de los GG comienza con la formación de la ceramida, en la parte externa de la membrana del retículo endoplasmático, mediante la condensación de palmitoil-CoA (o estearil-CoA) y serina. Se genera  $\beta$ -ceto-hidro esfingosina, que se reduce a hidroxidihidro esfingosina (mediado por NADH). La síntesis concluye con una acetilación y una desaturación (C4-C5). La ceramida es transportada al aparato de Golgi proximal (mecanismo no elucidado) insertándose en la cara citosólica de la membrana donde es glucosilada. La GlcCer se trasloca a la cara luminal de la membrana, donde se producen diversas glicosilaciones, la primera es la síntesis de LacCer. Entre las glicosilaciones se incluye la inserción de Sia por la acción de las SAT I (generación de GM<sub>3</sub>), II (GD<sub>3</sub>) y III (GT<sub>3</sub>) (Tettamanti, 2004).

A partir de LacCer, GM<sub>3</sub>, GD<sub>3</sub> y GT<sub>3</sub> se sintetizan las series de GG 0, a, b y c, respectivamente. En la síntesis de cada serie, las enzimas *N*-acetilgalactosaminil-transferasa, galactosil-transferasa y SAT IV y V introducen, secuencialmente, un residuo de *N*-acetilgalactosamina, galactosa y ácidos siálicos, respectivamente, para dar lugar a los GG más complejos (ver figura nº 9) (Tettamanti, 2004).

La síntesis está fuertemente regulada, para asegurar la distribución correcta de cada uno de los GG en fluidos y membranas celulares. En éstas hay enzimas que pueden glicosilar y desglicosilar para transformar los GG, sin pasar por el aparato de Golgi. Además se han descrito rutas de recuperación y reutilización de los GG (Tettamanti, 2004).



GalNAc-T, N-acetil-galactosaminil-transferasa; Gal-T2, galactosil-transferasa; SAT, sialiltransferasa.

**Figura nº9.** Esquema de síntesis de los gangliósidos de las series 0, a, b y c (Tettamanti, 2004).

### 3.3 Funciones

Gracias a su carácter anfipático y a su contenido en Sia los GG participan en una gran cantidad de funciones biológicas. Las más destacadas se indican a continuación:

- Funciones estructurales y de modulación: los GG participan en múltiples procesos de reconocimiento celular debido a la presencia de Sia. Por ejemplo, en los hematíes, la carga negativa del Sia en su superficie, impide que se agreguen por repulsión. En las membranas y vesículas sinápticas, los GG además confieren plasticidad (Varki, 2008).

Además de su función estructural, los GG modulan la formación y estabilización de dominios lipídicos en la membrana celular (zonas con diferente composición lipídica respecto al resto de la bicapa, responsables de la mayor o menor curvatura de ésta) (Sonnino, 2006).

- Funciones en el sistema nervioso: el tejido nervioso en desarrollo de los mamíferos es especialmente rico en GG; siendo fundamentales para el desarrollo neuronal (Abad-Rodríguez y Robotti, 2007).

Los GG actúan en la membrana de las células nerviosas como ligando de la glicoproteína asociada a mielina, cuyas funciones son mantener la estabilidad y estructura de la vaina de mielina en el axón neuronal y controlar la regeneración de los nervios (Vias y Schnaar, 2001).

Por otro lado, y en relación con la función de comunicación intercelular del Sia, los GG actúan como moduladores sinápticos, induciendo la apertura de los canales de calcio de las membranas presinápticas neuronales, y permitiendo así la transmisión de la señal nerviosa (Rahmann, 1995). También se ha descrito que pueden competir eficazmente con algunas sustancias neurotóxicas (Gupta *et al.*, 1990).

- Agente protector frente a patógenos entéricos: los microorganismos patógenos reconocen y se unen a los GG presentes en las membranas del enterocito (Séverin y Wenshui, 2005). Los GG presentes en los MFGM sirven de puntos de reconocimiento análogos a las células del hospedador inhibiendo la adhesión de microorganismo al enterocito. De esta forma protegen al lactante de diarreas infecciosas moderadas, o severas, causadas por *Campylobacter jejuni* (Usuki *et al.*, 2006), calicivirus y la toxina ST de

*E. coli* (Laegreid y Otnaess, 1986), *Helicobacter pylori* (Hata *et al.*, 2005), la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (Rueda *et al.*, 1998) y otros.

- Función prebiótica: por su naturaleza ácida, el Sia contribuye a disminuir el pH intestinal, lo cual favorece la colonización de la microbiota intestinal por parte de las bifidobacterias. Además, la propia cadena oligosacárida que forma parte de los GG presentes en los glóbulos de grasa de la leche, sirven como sustrato para las bacterias de la microbiota intestinal, actuando como agente prebiótico (Rueda *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que en niños alimentados con PL suplementado con la cantidad de GG presente en la LH, se favorece el crecimiento de bifidobacterias y probablemente de otras especies potencialmente patógenas, en detrimento del de *E. coli*, cuyo contenido fecal es mayor que en niños alimentados con PL no suplementadas (Rueda *et al.*, 1998),

- Función inmunitaria: los nutrientes que forman parte de la LH influyen directamente en el desarrollo del sistema inmune intestinal, observándose diferencias respecto a la lactancia artificial. Así, compuestos presentes en la LH en concentraciones muy bajas, como nucleótidos, IgA, GG y ácidos grasos poliinsaturados, son factores críticos en la expresión de la respuesta inmune a nivel intestinal (Rueda *et al.*, 2002).

La función inmunitaria de los GG se debe no sólo a su acción antimicrobiana demostrada *in vitro* e *in vivo*, sino también a que induce los procesos de proliferación y activación de las células T (Yuasa *et al.*, 1990; Ortaldo *et al.*, 1996) y la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th2 (Ebel *et al.*, 1992).

- Indicadores de patologías: la variación del contenido de los anticuerpos del GM<sub>1</sub> se utilizan como indicador de envenenamiento por plomo (Pérez-Aguilar *et al.*, 2008), por otra parte la disminución de GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub> y GD<sub>1b</sub>, a nivel plasmático, es indicadora del síndrome de Guillain-Barré (Zhang *et al.*, 2004; Willison, 2007), y la de GM<sub>2</sub> del síndrome Jatzkewitz-Pilz (Huang *et al.*, 1997).

### **3.4 Métodos de determinación en muestras biológicas y productos lácteos**

Para la determinación de GG totales es necesario realizar una extracción de la fracción grasa, seguida de aislamiento y purificación. En el caso de requerir la identificación y cuantificación de GG individuales se precisan técnicas de separación tales como cromatografía en capa fina (TLC) clásica, o de alta resolución (HPTLC).

En cualquiera de los casos, los métodos que se utilizan para la determinación final son comunes a los indicados para el Sia (ver apartado 2.4).

#### **A) Extracción, aislamiento y purificación de gangliósidos**

El primer método descrito y más frecuentemente utilizado para extraer y aislar los GG es el de Folch *et al.* (1957) que lo aplicaron a tejidos animales (cerebro). Se extrae la fracción grasa mediante mezclas de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y metanol (MetOH) en distintas proporciones. A continuación se extrae la fracción grasa más polar, en la que se encuentran los GG, utilizando una sal acuosa (partición).

Sobre este procedimiento básico, se han ido realizando modificaciones y adaptaciones a nuevas matrices. Algunos autores han optimizado métodos para aislar GG de tejidos y/o fluidos animales (Suzuki, 1965; Yu y Leeden, 1972; Tettamanti *et al.*, 1973; Svennerholm y Fredman, 1980; Ladisch y Gillard, 1985) y de leche y sus derivados, entre los que se encuentran los preparados infantiles (Puente *et al.*, 1992; Sánchez-Díaz *et al.*, 1997). En el cuadro nº 10 se muestra un resumen de los métodos propuestos por estos autores. Es importante destacar los pocos trabajos en los que se determinan GG en leche o derivados (incluidos productos de alimentación infantil).

Las modificaciones del método de Folch propuestas por Suzuki (1965), para la extracción de GG en tejido cerebral y extraneural, en el que utiliza disoluciones acuosas de NaCl o KCl junto a los disolventes orgánicos, proporcionan unos rendimientos de extracción y aislamiento mejores que los conseguidos por el método original (Folch *et al.*, 1957); aunque la extracción de los GG menos polares no es cuantitativa, hecho a tener en cuenta en tejidos extraneurales, donde estos GG son los mayoritarios. Tettamanti *et al.* (1973) mejoran la extracción de GG cerebrales utilizando tetrahidrofurano, a pH 6,8. Si bien el extracto presenta un alto contenido de fosfolípidos que interfieren en su determinación posterior. El método propuesto por Svennerholm y Fredman (1980) permite una extracción cualitativa de los GG de tejido cerebral, con el rendimiento más alto, pero requiere de más cantidad de muestra, por lo que es uno de los menos utilizados.

En fluidos biológicos, donde el contenido total de GG es del orden de 10 veces menor que en tejidos biológicos, o en estos, cuando se dispone

de poca cantidad de muestra, se hace necesaria la eliminación de interferentes. Los principales interferentes son iones dipolares y moléculas neutras, sulfátidos, ácidos grasos libres y proteínas. En general su eliminación se lleva a cabo mediante una partición secuencial con disolventes de distinta polaridad, y/o cromatografía de intercambio iónico, DEAE-Sephadex, y/o tratamiento con una base, y/o cromatografía con ácido silícico (Yu y Ledeen, 1972; Colarow *et al.*, 2003). Ladisch y Gillard (1985) incorporan una purificación, mediante la partición de la fracción grasa con éter/1-butanol/NaCl acuoso, que mejora la recuperación. Por ello este método es de elección para muestras biológicas, con un contenido bajo de GG y/o alto de interferentes.

**Cuadro n° 10.** Métodos de extracción, aislamiento y purificación de gangliosidos en tejidos y fluidos animales y en leche y derivados

<b>Matriz</b>	<b>Extracción lipídica</b>	<b>Aislamiento/Purificación</b>	<b>Referencia</b>
Tejido cerebral	CHCl <sub>3</sub> : MetOH 2:1 / homogeneización / filtración con papel libre de grasa o filtro de cristal sinterizado	Adición de agua ó CaCl <sub>2</sub> 0,04 % ó MgCl <sub>2</sub> 0,034 % ó NaCl 0,58 % ó KCl 0,74 % / agitación vigorosa / centrifugación Eliminación de la fase superior CHCl <sub>3</sub> : MetOH : agua ó solución salina 3:48:47 (x3) / CHCl <sub>3</sub> : MetOH (2:1)	Folch <i>et al.</i> (1957)
Leche bovina, humana y preparados infantiles	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01M (pH 6,8) / THF (1:8) / centrifugación (12 000xg 15°C 10 min) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01M (pH 6,8) : THF (1:4) (x3)	Eter etílico / centrifugación / agua / centrifugación Combinación fases acuosas, dialización en frío frente a agua destilada (2 - 3d)	Tettamanti <i>et al.</i> (1973)
Tejido cerebral y extra neuronal	a) Tejido húmedo: CHCl <sub>3</sub> : MetOH (2:1) homogeneización mecánica (5 min) b) Tejido seco: adición de agua / 0° C / filtración con papel libre de grasa / CHCl <sub>3</sub> : MetOH (1:2) con 5 % agua / filtración con papel libre de grasa	KCl 0,1M ó NaCl 0,1M / centrifugación a baja velocidad / reservar fase superior CHCl <sub>3</sub> : MetOH : NaCl 0,58 % ó KCl 0,74% (3:48:47) / mezclar vigorosamente / centrifugación / reservar fase superior CHCl <sub>3</sub> : MetOH : agua (3:48:47) / centrifugación / reservar fase superior	Neeser <i>et al.</i> (1991)
Tejido cerebral	Redisolución: CHCl <sub>3</sub> hasta alcanzar CHCl <sub>3</sub> : MetOH (2:1) ó secado / CHCl <sub>3</sub> : MetOH (2:1)	Combinar fases superiores / reducir el volumen a la mitad en rotavapor / liofilización / reconstitución agua / dialización frente a agua destilada (1 - 2d, 4°C)	Suzuki (1965)
Tejido cerebral	CHCl <sub>3</sub> : MetOH : agua (4:8:3) (x2) CHCl <sub>3</sub> : MetOH : agua (4:8:5.6)	MetOH / KCl 0,01M / centrifugación a baja velocidad (x2) Dialización en frío frente a agua destilada (2 - 3d)	Svennerholm y Fredman (1980)
Leche bovina			Laegreid <i>et al.</i> (1986)

**Cuadro n° 10 (continuación).** Métodos de extracción, aislamiento y purificación de gangliósidos en tejidos y fluidos animales y en leche y derivados

<b>Matriz</b>	<b>Extracción lipídica</b>	<b>Aislamiento/Purificación</b>	<b>Referencia</b>
Tejidos y fluidos animales	a) CHCl <sub>3</sub> : MetOH (1:1) / evaporación / enfriamiento (-20°C) / centrifugación / sequedad (N <sub>2</sub> )	DIPE : 1-ButOH (6:4) / vortexar / sonicación / NaCl 50mM / vortexar / sonicación / centrifugación (750xg 10min) (x2)	Ladisch y Gillard (1985)
	b) CHCl <sub>3</sub> : MetOH : agua (4:8:3) ó THF : K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01M (pH 6.8) (1:4) / sequedad / redisolución en CHCl <sub>3</sub> : MetOH (1:1) / centrifugación / sequedad (N <sub>2</sub> )	Liofilización de la fase acuosa Redisolución en agua destilada / sonicación / Sephadex G-50 Elución con agua destilada / liofilización Redisolución en CHCl <sub>3</sub> : MetOH (1:1) / sonicación / centrifugación	
Leche humana y preparados infantiles			
Leche bovina y humana	Liofilización muestra / lavado acetona fría (-20°C)	Partición de Folch	Puente <i>et al.</i> (1992, 1994)
	Extracción CHCl <sub>3</sub> : MetOH (2:1, 1:2, 1:1) / sequedad Redisolución CHCl <sub>3</sub> : MetOH (2:1)	Redisolución agua / dialización frente a agua destilada (5 d, 4°C) Liofilización / redisolución CHCl <sub>3</sub> : MetOH : agua (60:30:4,5) Cromatografía Sephadex A-25	Neesser <i>et al.</i> (1991)
Preparados infantiles			Martín-Sosa <i>et al.</i> (2004)
			Sánchez-Díaz <i>et al.</i> (1997) Colarow <i>et al.</i> (2003)
MFGM de vaca			Sánchez-Juanes <i>et al.</i> (2009)

1-ButOH, 1-butanol; CHCl<sub>3</sub>, cloroformo; DIPE, diisopropil éter; MetOH, metanol; THF, tetrahidrofurano.

En cuanto a la leche y derivados lácteos, los GG están presentes en bajas cantidades, acompañados de una gran cantidad de los interferentes descritos anteriormente y se localizan en las MFGM, por esto la extracción de la grasa es algo más compleja. En primer lugar se deben liofilizar las muestras, posteriormente se eliminan los lípidos neutros utilizando acetona, y extracciones con  $\text{CHCl}_3$ :MetOH en distintas proporciones, y se concluye con una partición, como la descrita anteriormente. Antes de realizar cada una de las extracciones, se procede a homogeneizar la muestra con los disolventes de cada etapa de extracción con ayuda del politrón para romper las MFGM. Todas las extracciones se realizan a temperatura de refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ), para asegurar que los GG no son extraídos durante los lavados con acetona y que sí lo son en los realizados con  $\text{CHCl}_3$ :MetOH (en estas condiciones se encuentran formando agregados de alto peso molecular). En algunas muestras, además de la purificación descrita en fluidos biológicos, es necesario realizar una diálisis previa final frente a agua, a  $4^\circ\text{C}$ , para eliminar compuestos de bajo peso molecular como sales, lactosa, glicoesfingolípidos cargados (sulfátidos, etc.) y de bajo peso molecular (LacCer) (Puente *et al.*, 1992; Sánchez-Díaz *et al.*, 1997; Sánchez-Juanes *et al.*, 2009).

#### B) Determinación de gangliósidos

La separación más usual de GG es por HPTLC, utilizando como fase estacionaria sílica 60. Müthing (1996) recomienda cargar de 5 a 10  $\mu\text{g}$  de ácido siálico unido a lípidos (ASUL) para obtener un buen perfil de GG. En general, la fase móvil que permite una mejor separación de GG es  $\text{CHCl}_3$ :MetOH:0,2%  $\text{CaCl}_2$  (55:45:5, v/v/v) en la que los GG se separan de

mayor a menor polaridad. Incluso llega a separarse un mismo GG en dos bandas, atendiendo a los ácidos grasos y las bases esfingoides que lo componen. Por ejemplo el GD<sub>3</sub> de origen lácteo se separa en dos bandas, en la superior se encuentra el GD<sub>3</sub> con ácidos grasos de mayor peso molecular, y en la inferior los de menor (Pörtner *et al.*, 1993).

El orcinol fue el primer reactivo utilizado como revelador (Svennerholm, 1956). Svennerholm (1957) mejoró la visualización de las bandas, utilizando como agente revelador el resorcinol, que da bandas de coloración violeta-azul, tras incubar a 100°C durante 15 minutos. Con este reactivo los glicolípidos neutros y los sulfátidos dan una coloración parduzca, lo que permite diferenciar los GG fácilmente. También se ha utilizado el revelado con HCl al 18%, requiriendo la misma incubación que en el caso del resorcinol (Hayakawa y Hirai, 2003).

Los GG pueden identificarse por comparación con disoluciones patrón obtenidas de cerebro bovino u otras especies y/o tejidos (Sánchez-Díaz *et al.*, 1997). El revelado con resorcinol permite la cuantificación directa en placa por densitometría óptica a 580 nm. Este método fue validado por Ando *et al.* (1978) utilizando GG a partir de cerebros de distintas especies, obteniendo un intervalo de linealidad entre 0,09 y 10 nmoles. Es una técnica reproducible, sencilla y rápida que se ha aplicado a la cuantificación de GG individuales (GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, GM<sub>3</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> y GT<sub>1b</sub>) en tejidos animales (Leeden y Yu, 1983) y líneas celulares (Ferreira *et al.*, 2004), así como en leche y preparados infantiles (GM<sub>3</sub>, GD<sub>3</sub> y GT<sub>3</sub>) (Sánchez-Díaz *et al.*, 1997).

También se ha utilizado la densitometría de imagen asistida por ordenador, donde se obtiene una imagen de la placa mediante un dispositivo específico, que ilumina la placa a la longitud de onda deseada, que es procesada por un *software* que evalúa el color y la densidad del mismo. Esta técnica se ha utilizado, en placas reveladas con resorcinol (580 nm), para la cuantificación de mezclas de patrones de GM<sub>1a</sub>, GM<sub>3</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>3</sub>, obteniendo buenas respuestas lineales entre 0,01 y 5 nmoles (Petrovic *et al.*, 2000). Y se han cuantificado mezclas de patrones de GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub> y GT<sub>1b</sub>, en un intervalo de linealidad que va de 0,047 a 4,5 nmoles, utilizando placas reveladas con HCl (365 nm) (Hayakawa y Hirai, 2003).

Debido a la gran variabilidad estructural que presenta cada GG, los patrones no siempre se desarrollan a la misma altura que los GG de las muestras. La forma más efectiva para identificarlos es mediante inmunoensayos. Se basan en la propiedad de los GG para actuar como receptores específicos de virus, bacterias y toxinas. Se utilizan anticuerpos monoclonales y policlonales, que reconocen específicamente distintos tipos de Sia y cadenas glucídicas de los GG. Para llevar a cabo este tipo de identificaciones, sobre los GG separados en placa, se superpone un agente primario (anticuerpo, toxina, lectina,...) que se incuba y lava para posteriormente superponer un agente secundario (anticuerpo secundario) que se revela con un reactivo específico, o usando rayos X (Müthing y Mühlradt, 1988; Yoshino *et al.*, 1993; Schnaar *et al.*, 2000).

Se han desarrollado diversos métodos para la determinación de GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, GM<sub>4</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>3</sub>, O-Acetyl-GD<sub>3</sub>, GT<sub>1a</sub>, GT<sub>1b</sub> y polisialogangliosidos en distintos tejidos animales (Müthing y Mühlradt, 1988; Yoshino *et al.*,

1993; Vázquez *et al.*, 1995; Schnaar, 2000). En particular el GM<sub>1</sub> se une específicamente a la toxina del cólera (Edwards y March, 2007); el *O*-acetil-GD<sub>3</sub> se identifica con el virus C de la gripe (Fahr y Schauer, 2001) GD<sub>1a</sub> y GT<sub>1b</sub> se pueden identificar con el virus BK (Low *et al.*, 2006). El GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub> de origen lácteo (MFGM) se identifican con *E. coli* (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009).

Para la identificación de GG no sólo se utilizan estas técnicas de superposición, también se utilizan técnicas de detección de masas, si bien su sensibilidad es menor a las técnicas anteriormente descritas, ofrecen una mayor información sobre la estructura. Antiguamente se utilizaba la fuente de ionización por bombardeo rápido con átomos, sobre los GG extraídos de las bandas de TLC (Katalinic, 1994). Esta técnica se ha utilizado para la determinación de GM<sub>1</sub> en sistemas modelo (Pahlsson y Nilsson, 1988), y GM<sub>3</sub> en tejidos humanos (Karlsson *et al.*, 1991). El problema, a parte de la preparación de la muestra, es la pérdida de los GG tras el análisis.

Actualmente se utilizan las técnicas de MALDI-TOF, sin necesidad de extraer los GG de las placas de TLC/HPTLC. En este caso debe pretratarse la superficie de la sílice con glicerol para evitar irregularidades. Con esta técnica se ha identificado GM<sub>3</sub> en células de ovario de hámster chino (Dreisewerd *et al.*, 2005); GM<sub>3</sub>, GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> y GT<sub>1b</sub> en tumores de páncreas y hepático (Distler *et al.*, 2008). En modo negativo se consigue un grado de fragmentación de los GG muy bajo, con lo que se pueden elucidar estructuras completas; en general se determinan los GG desprotonados o formando aductos con glicerol o NaCl. En modo positivo, se sigue manteniendo una buena reproducibilidad, pero los GG se

fragmentan por la cadena glucídica, especialmente se pierden unidades de Sia.

Dreisewerd *et al.* (2005) han aplicado el MALDI-TOF a la cuantificación de GM<sub>3</sub>, utilizando como respuesta, frente a la concentración de éste, la intensidad de la señal correspondiente al ion del ácido graso C16:0 [M-H]<sup>-</sup> dividido por la intensidad de la señal del ion [G3Na].

Algunos autores han propuesto la utilización de MALDI-TOF a alta presión, usando un método de refrigeración vibracional, para la identificación de GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GT<sub>1b</sub>, GQ<sub>1b</sub>, GP<sub>1b</sub> y GP<sub>1c</sub> en disoluciones patrón (O'Connor *et al.*, 2001 y 2002), evitándose la pérdida de Sia durante la desorción al aumentar la presión a 10 mbares y la formación de aductos por el efecto del refrigerante. Posteriormente se ha aplicado esta técnica a la identificación de GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, GD<sub>2</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> y GT<sub>1b</sub> y GD<sub>3</sub> en mezclas de patrones y cerebro bovino, llegando a detectarlos a 100 fmoles (Ivleva *et al.*, 2004 y 2005).

Actualmente se están desarrollando técnicas que combinan la separación de los GG individuales con la identificación y la cuantificación, en un solo paso, utilizando LC-ESI-MS/MS. Mediante esta técnica se han determinado GD<sub>3</sub> y GM<sub>3</sub> en leche y preparados infantiles, obteniendo un coeficiente de variación del 5 y el 14% para cada uno de ellos respectivamente, así como unas recuperaciones del 83 y 87%, respectivamente (Sorensen, 2006).

### 3.5 Contenidos en leche y preparados infantiles

En la leche, los GG se encuentran en el MFGM. Su situación en la membrana externa del glóbulo de grasa les confiere gran superficie de contacto con el medio (1 mL de calostro bovino tiene unos 6000 cm<sup>2</sup> de material de membrana) (Zancada, 2008).

Los contenidos de GG totales y el porcentaje relativo de GG descritos en la bibliografía, como en el caso del Sia presentan una gran variabilidad, asociada a factores genéticos, geográficos y dietéticos (Wang, 2009).

En promedio, la LH es la que presenta un mayor contenido total de GG, seguida de la leche de búfala y la de vaca (ver cuadros nº 11 y 12). Las leches de cabra y oveja, son con diferencia, las que presentan unos menores contenidos.

En la LH, los contenidos totales varían a lo largo de la lactación (en mg ASUL/L: calostro 2,4-9,5; transición 1,4-3,6; madura 0,3-4,6) (ver cuadro nº 11). Este mismo hecho se manifiesta también en otros mamíferos (en mg ASUL/L: vaca de 7,4 a 1,4; cabra de 0,9 a 0,2; búfala 7,3 a 2,1). Algunos autores indican que el contenido de GG está directamente relacionado con la cantidad de grasa (Puente *et al.*, 1996), lo que podría explicar este descenso del contenido total de GG a lo largo de la lactación.

**Cuadro n° 11.** Contenidos de gangliósidos totales (GG<sub>T</sub>), expresados en mg ASUL/L y porcentajes relativos de gangliósidos individuales (GG<sub>i</sub>) en leche humana.

Período lactación (días)	Descripción estudio (n)	GG <sub>T</sub>			GG <sub>i</sub>			Referencia
		GM <sub>3</sub>	GM <sub>2</sub>	GM <sub>1</sub>	GM <sub>3</sub>	GM <sub>2</sub>	GM <sub>1</sub>	
14-70	Noruega (10)	11	2	0,1	25	nd	Laegreid <i>et al.</i> (1986)	
2	Japón (17)	7,3	--	--	70	--	Takamizawa <i>et al.</i> (1986)	
3		4,8	--	--	69	--		
4		5,8	--	--	70	--		
6		6,9	--	--	69	--		
8		4,1	--	--	62	--		
10		3,6	--	--	61	--		
40		4,6	--	--	41	--		
120		4,4	--	--	21	--		
390	4,0	85	--	9	--			
12	Suiza (1)	10,4	--	--	--	--	Neeser <i>et al.</i> (1991)	
2-6	Japón (19)	9,5	3,3	nd	48,9	nd	Pan e Izumi (2000)	
7-46		9,1	27,7	nd	31,8	nd		
1-4	España (12)	2,4	--	--	--	--	Martín-Sosa <i>et al.</i> (2004)	
12-17		1,4	--	--	--	--		
28-32		0,3	--	--	--	--		
3-4	Japón (-)	5,5	29	nd	0,02	69	Iwamori <i>et al.</i> (2008)	

n, número de individuos; nd, no detectado; --, no analizado

**Cuadro n° 12.** Contenidos de gangliosidos totales (GG<sub>T</sub>), expresados en mg ASUL/L y porcentajes relativos de gangliosidos individuales (GG<sub>i</sub>) en leche de otros mamíferos.

Muestra	Período lactación (días)	GG <sub>T</sub>	GG <sub>T</sub>			GG <sub>i</sub>			Referencia
			GM3	GM2	GMI	GM2	GMI	GT3	
Vaca									
- Fresca	Madura	11	3	6	0,01	80	nd	Laegreid (1986)	
- Fresca	Madura	2,0	--	--	--	--	--	Neeser (1991)	
- Pasteurizada		2,2	--	--	--	--	--		
- UHT		2,4	--	--	--	--	--		
- Fresca	1	7,4	15	nd	nd	68	16	Puente <i>et al.</i> (1992)	
	2	6,4	24	nd	nd	61	6		
	3	2,1	25	nd	nd	60	7		
	5	2,3	27	nd	nd	58	3		
	30	1,3	20	nd	nd	60	5		
	90	1,3	14	nd	nd	61	6		
	180	1,4	10	nd	nd	65	9		
- Fresca	Madura	0,1-0,5	11,5-25,0	nd	nd	49,2-67,0	1,3-7,2	Puente <i>et al.</i> (1996)	
- Fresca	Madura	3,9	2,8	nd	nd	61,0	nd	Pan e Izumi (2000)	
- Fresca	Madura	2,6	--	--	--	--	--	Colarow <i>et al.</i> (2003)	
- Fresca	Madura	3,2	12,3	3,2	0,07	69,8	5,2	Iwamori <i>et al.</i> (2008)	
- Fresca	Madura	0,7	19,1	nd	nd	59,4	8,0	Sánchez-Juanes <i>et al.</i> (2009)	
- Desnatada en polvo	Madura	0,1	--	--	--	--	--	Moore <i>et al.</i> (2000)	
- UHT	Madura	0,6	--	--	--	--	--		
Cabra									
- Fresca	1	0,9	34,5	nd	nd	38,4	11,3	Puente <i>et al.</i> (1994)	
	2	0,5	27,3	nd	nd	51,6	12,8		
	8	0,2	23,4	nd	nd	42,2	6,6		
	15	0,2	18,4	nd	nd	35,1	12,2		
	60	0,2	15,0	nd	nd	54,1	7,7		

n, número de individuos; nd, no detectado; --, no analizado

**Cuadro n° 12 (continuación).** Contenidos de gangliosidos totales (GG<sub>T</sub>), expresados en mg ASUL/L y porcentajes relativos de gangliosidos individuales (GG<sub>i</sub>) en leche de otros mamíferos.

Muestra	Periodo lactación (días)	GG <sub>T</sub>	GG <sub>T</sub>			GG <sub>i</sub>	GG <sub>1</sub>	GG <sub>2</sub>	GG <sub>3</sub>	GG <sub>3</sub>	GG <sub>3</sub>	Referencia
			GM3	GM2	GM1							
Cabra	- Fresca	0,02-0,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	Puente <i>et al.</i> (1996) Iwamori <i>et al.</i> (2008)
	- Fresca	3,2	4,1	nd	0,77	68,6	10,9	--	--	--		
Oveja	- Fresca	0,49	--	--	--	--	--	--	--	--	--	Puente <i>et al.</i> (1995)
		0,42	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
		0,21	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
		0,07	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
		0,09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
		0,08	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	Madura	0,5-0,1	--	--	--	--	--	--	--	--	Puente <i>et al.</i> (1996)	
Búfala	- Fresca	7,3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	Colarow <i>et al.</i> (2003)
		2,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	

n, número de individuos; nd, no detectado: --, no analizado

Los perfiles de GG, en LH, también varían con el tiempo de lactación. Mientras que en el calostro hay un mayor porcentaje de GD<sub>3</sub> que de GM<sub>3</sub> (49-70% vs. 3-29%), en la leche madura se invierte esta relación (GD<sub>3</sub> 9-32% vs. GM<sub>3</sub> 85-28%). Algunos autores indican que estos cambios en la distribución podrían estar relacionados con el papel que desempeña GD<sub>3</sub> en la diferenciación y proliferación celular en las glándulas mamarias (Takamizawa et al., 1986), lo que haría que este GG fuese el mayoritario en el calostro. Este hecho, a su vez iría relacionado con los mayores requerimientos de GD<sub>3</sub> en las primeras etapas de la vida, para el correcto desarrollo neuronal e intestinal (Takamizawa et al., 1986).

En leche de otros mamíferos no se observa una variación, tan acusada, en los perfiles de GG, como en la LH. Tanto en la leche de vaca como en la de cabra, el gangliósido mayoritario es GD<sub>3</sub> seguido de GM<sub>3</sub>. Estos perfiles son similares a los del calostro humano.

Hay pocos estudios del contenido de GG en preparados infantiles. De ellos son destacables aquellos en los que se comparan los contenidos de GG de los preparados con leche humana y de vaca (ver cuadro nº 13).

El primer estudio comparativo fue llevado a cabo por Laegreid *et al.* en 1986, y su objetivo era comparar el contenido de GG presentes en leche humana, bovina y preparados infantiles. Como se observa en el cuadro nº 13, el contenido de GG en los preparados es aproximadamente la mitad que en leche humana y de vaca. Este es el primer estudio en el que se da el perfil de GG de los preparados infantiles, similar al de la leche de vaca.

**Cuadro n° 13.** Contenidos de gangliósidos totales (GG<sub>T</sub>), expresados en mg ASUL/L y porcentajes relativos de gangliósidos individuales (GG<sub>i</sub>) en preparados para lactantes (PL) y de continuación (PC).

Preparado (n)	Caseína/ Seroproteínas	GG <sub>T</sub>			GG <sub>i</sub>			Referencia
		GM3	GM2	GMI	GM3	GM2	GMI	
PL y PC	--	6	7	<0,01	82	nd	Laegreid (1986)	
PL y PC	100/0 82/18 40/60 0/100	<0,5 4,6 3,8 6,2	-- -- -- --	-- -- -- --	-- -- -- --	-- -- -- --	Neeser <i>et al.</i> (1991)	
PL PC	40/60 --	0,9-1,4 0,3-1,2	2,3-10,9 2,0-4,4	nd nd	64,9-72,3 72,1-80,3	3,4-17,1 1,1-10,1	Sánchez-Díaz <i>et al.</i> (1997)	
Hidrolizado	-- -- --	4,5 4,5 4,9	0,3 2,6 1,7	nd nd nd	86,6 72,4 81,5	nd nd nd	Pan e Izumi (2000)	

n, número de individuos; nd, no detectado; --, no analizado

Posteriormente, Neeser *et al.* (1991) determinan el contenido de GG en leche de vaca (fresca, pasteurizada y UHT), LH, preparados infantiles (PL e hidrolizados) con distinta proporción caseína/suero, y los sueros utilizados en su elaboración. Los mayores contenidos se encuentran en la LH, seguida de los sueros con concentraciones del mismo orden a la LH (en mg ASUL/L, con una reconstitución del 3,5% (p/v): desmineralizo 8,8 y concentrado 10,4), los preparados infantiles (que contienen la mitad aproximadamente) y la leche de vaca (5 veces menos que la LH). Los preparados infantiles presentan contenidos de GG superiores a los de la leche de vaca, hecho atribuido a la ruptura de los glóbulos grasos (ricos en GG), durante la preparación de los ingredientes, repartiéndose los GG en las distintas fracciones (grasa, sólidos no solubles y/o suero). La adición del suero en los preparados infantiles, hace que estos tengan más GG. Por último cabe resaltar que los autores no observan una relación entre el origen de la grasa o el tratamiento térmico y el contenido de GG, sino más bien, con la adición de sueros ricos en GG como ingredientes.

Pan e Izumi (2000) comparan la cantidad de GG totales e individuales de calostro y leche madura humana, leche de vaca y preparados infantiles hidrolizados. Obtienen resultados similares a los de Laegreid *et al.* (1986) (ver cuadros nº 11-13), excepto el contenido total de GG en leche de vaca, que es inferior.

La utilización de los preparados infantiles no cubre las ingestas en cantidad y calidad de GG, que aporta la LH. Estas diferencias pueden redundar en problemas en el desarrollo cerebral, crecimiento, protección frente a enteropatógenos y en sistema inmune (Pan e Izumi, 2000). Por ello

es de interés estudiar la suplementación de estos productos destinados a la alimentación infantil.

## 4. *Biodisponibilidad*

### 4.1 Definiciones

El término *biodisponibilidad* (BD), desde un punto de vista nutricional, indica la eficacia con la que los componentes (nutrientes y no nutrientes) de un alimento son utilizados. Así pues, la BD depende de los procesos de digestión de los alimentos, absorción de sus componentes y disponibilidad de los mismos para las funciones metabólicas (Cilla, 2009). A continuación, se recogen distintas definiciones de BD propuestas por varios autores:

- La medida de la capacidad del organismo humano y de los animales, o la efectividad, por la cual los nutrientes, en una forma química determinada, son liberados de los alimentos en presencia de ciertos componentes dietéticos. Incluye además la absorción intestinal y el transporte de nutrientes a los órganos y células, donde finalmente cumplen su función biológica (Schelmmmer, 1995).

- Cantidad de nutriente disponible para absorberse en una forma fisiológicamente útil (Van Campen y Glahn, 1999).

- La fracción de elemento que es solubilizado y finalmente absorbido a partir del tracto gastrointestinal y que llega a la circulación sistémica (Caussy, 2003).

De las definiciones expuestas se deduce que la BD consta de 3 etapas (Cilla, 2009):

1. Disponibilidad química o física del elemento en el tracto gastrointestinal, es decir, fracción del elemento ingerido disponible para la posterior absorción.
2. Absorción en la mucosa intestinal, que puede implicar un proceso de difusión pasiva o transporte paracelular no saturable y/o un proceso de captación, o transporte transcelular, por las células de la mucosa intestinal.
3. Transformación del elemento en su forma biológicamente activa.

En la BD influyen dos tipos de factores: fisiológicos o intrínsecos al organismo, y dietéticos o extrínsecos. Sus efectos pueden ser acumulativos, de ahí la complejidad de las interacciones (Fairweather-Tait, 1996).

Entre los factores intrínsecos cabe mencionar: variabilidad interindividual, posibles anomalías genéticas, edad y estados fisiopatológico y nutricional, microbiota intestinal y, de una forma especial, la capacidad individual de adaptación a aportes variados de nutrientes, susceptible de influir en su disponibilidad para su posterior absorción y metabolismo. Entre los factores de tipo extrínseco se incluyen: el aporte total por la dieta, forma química en que se encuentre, solubilidad e interacción con otros componentes del alimento o dieta (Barberá y Farré, 1992).

Los métodos utilizados en los estudios de BD pueden clasificarse en dos grandes grupos: *in vivo* e *in vitro* (Barberá y Farré, 1992; Van Campen y Glahn, 1999).

En el organismo humano existen factores fisiológicos difícilmente reproducibles en el laboratorio, lo cual sitúa a los métodos *in vivo* como

aquellos que proporcionan la mejor estimación de la BD de componentes (micronutrientes o no) a partir de alimentos (Van Campen y Glahn, 1999). Entre estos métodos cabe destacar el balance químico, el empleo de isótopos, tanto radioactivos como estables, así como los ensayos con animales, aunque en estos últimos el principal inconveniente radica en la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos al hombre, debido a las diferencias entre los metabolismos animal y humano (Wienk *et al.*, 1999).

Los sistemas *in vitro*, que simulan las condiciones fisiológicas, constituyen una alternativa a los estudios *in vivo* y pueden predecir la situación *in vivo*. Características como su rapidez, relativo bajo coste, sencillez y mejor control de las variables experimentales, han propiciado su creciente utilización para evaluar la BD de distintos componentes de los alimentos (Ekmekcioglu, 2002).

Mediante estudios *in vitro* se pueden simular las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, tiempo de incubación) del tracto gastrointestinal, y evaluar las posibles transformaciones de los compuestos inicialmente presentes en el alimento, así como las interacciones entre los distintos componentes del alimento que puedan acontecer durante su tránsito intestinal. Sin embargo, estos métodos proporcionan estimaciones relativas y no absolutas de la BD, puesto que no tienen en cuenta determinados factores fisiológicos intrínsecos del organismo (estado nutricional, secreción gastrointestinal, microbiota intestinal, transporte activo, interacciones con la mucosa, cinética del tránsito intestinal, etc.) (Van Campen & Glahn, 1999; Wienk *et al.*, 1999).

El primer paso para determinar la BD *in vitro* es evaluar la solubilidad de los compuestos objeto de estudio tras la digestión, ya que es la fracción soluble o *bioaccesible* (FB), la que es transportada para su absorción en los enterocitos. Se define la FB como la cantidad de un constituyente de un alimento que está presente en el intestino como consecuencia de su liberación de la matriz alimentaria, y que podría ser potencialmente absorbida (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

Las digestiones *in vitro* se basan, generalmente, en la simulación del proceso de digestión gastrointestinal humano. Se realiza un tratamiento secuencial enzimático en dos etapas, gástrica con pepsina a pH 1.8-2.5, e intestinal con pancreatina y sales biliares a pH 5-6.5 (Cilla, 2009). Las digestiones pueden modificarse atendiendo al grupo de edad que se pretende estudiar. Para simular las condiciones gástricas del recién nacido, el pH se ajusta a 4 (Pascuzzo, 2008), en estas condiciones la pepsina sigue siendo activa (Piper y Fenton, 1965). Tras la digestión gastrointestinal se determina la cantidad de componente soluble en el sobrenadante obtenido por centrifugación (Crews *et al.*, 1983) o filtración (Narasinga y Prabhavathi, 1978).

Los estudios de *bioaccesibilidad* proporcionan datos útiles que permiten establecer comparaciones entre los distintos alimentos y determinar el efecto causado por diferentes factores sobre la BD (Azenha y Vasconcelos, 2000; Argyri *et al.*, 2006).

Formando parte de los métodos *in vitro* de evaluación de la BD, los métodos que simulan el proceso de digestión gastrointestinal, en combinación con cultivos celulares de enterocitos, permite evaluar los

procesos de captación y transporte a partir de la FB obtenida del alimento (Ekmekcioglu, 2002). La línea celular más utilizada para este tipo de estudios son las células Caco-2, modelo validado de epitelio intestinal, cuando se encuentran diferenciadas.

La línea celular Caco-2 fue establecida en 1977 por Fogh *et al.*, a partir de un adenocarcinoma de colon humano, moderadamente bien diferenciado, obtenido de un paciente de 72 años de raza caucasiana. Estas células tienen la propiedad de crecer en cultivo adheridas a un sustrato formando monocapa y cuando alcanzan la confluencia, se diferencian espontáneamente para dar lugar a una monocapa polarizada que presenta muchas de las características funcionales y morfológicas de los enterocitos humanos maduros: organización de las células dentro de una monocapa polarizada, formación de domas, uniones intercelulares estrechas, microvellosidades en el lado apical y enzimas de secreción propias de la membrana del borde en cepillo, como fosfatasa alcalina, sacarasa-isomaltasa, lactasa, etc (Pinto *et al.*, 1983).

Recientemente Schanbl *et al.* (2009a) han determinado el contenido de GG en células Caco-2 no diferenciadas (0,75  $\mu\text{g}$  ASUL/mg proteínas) y diferenciadas (1,73  $\mu\text{g}$  ASUL/mg proteínas). Las células Caco-2 contiene GM<sub>3</sub>, GD<sub>3</sub>, GM<sub>1</sub> y GM<sub>2</sub> (no diferenciadas: 32, 21, 17 y 16,5%, respectivamente; diferenciadas: 19,5, 45, 4,5, 7,5%, respectivamente).

## 4.2 Biodisponibilidad de ácido siálico y gangliósidos

### - Métodos *in vivo*

Se han realizado estudios de BD de Sia en ratas y ratones (Nohle *et al.*, 1981, 1982 y 1984), así como en cerdos (Wang *et al.*, 2007). En todos ellos se administra Sia marcado radiactivamente [ $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$ ] y se determina su incorporación a las fracciones de glúcidos y/o proteínas o su forma libre, en el tracto gastrointestinal, el torrente sanguíneo y/u orina. De estos estudios se deduce que la absorción de Sia libre es más rápida que en forma conjugada, siendo la absorción más lenta la de glicoproteínas conteniendo Sia (Nohle *et al.*, 1981, 1982 y 1984). El Sia presente en LH, unido a glúcidos en su mayor proporción, debe ser el mejor absorbido (Wang, 2009).

Se ha comprobado que el metabolismo del Sia depende no sólo de la especie y edad del animal sino también de la forma en que el Sia esté presente (libre o combinado). La incorporación al cerebro de Neu5Ac, tras dos horas de la inyección intravenosa de éste doblemente marcado ( $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ) es más rápida en ratas lactantes que en adultas (Nohle *et al.*, 1981 y 1984). En cerdos recién nacidos la incorporación a nivel cerebral de Sia, administrado por vía intravenosa como  $^{14}\text{Neu5Ac}$ , es más alta en estos que en ratas adultas, pero más bajas que en ratas lactantes (Wang *et al.*, 2007).

La influencia de la vía de administración es controvertida. Mientras Nohle *et al.* (1981) observan que tras la administración por vía intraperitoneal de Neu5Ac (5 mg/kg durante 1 día) marcado radiactivamente ( $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ ) a ratas, de más de 3 meses, se incorpora más rápidamente a nivel

cerebral, intestinal y sanguíneo, que por vía intragástrica. Carlson y House (1986) no obtienen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de GG en cerebro y cerebelo de ratas (14-21 días post-parto), tras la administración de la misma cantidad de Neu5Ac, por vía intraperitoneal e intragástrica (20 mg/kg durante 3 días consecutivos). Las diferencias encontradas entre estos estudios parecen estar centradas, más que en la vía de administración, en la edad de las ratas utilizadas, ya que hay una disminución de la actividad de las neuranimidasas intestinales con el envejecimiento (Dickson y Messer, 1978).

Con respecto a la BD de GG, Park et al. (2005a) realizan un estudio caso-control con ratas (18 días) alimentadas durante 2 semanas con una dieta conteniendo 20% de grasa que incorpora una mezcla de GG (80% GD<sub>3</sub>, 9% GD<sub>1b</sub>, 5% GM<sub>3</sub> y 6% otros) que suponen el 0,1% de la grasa total. Observan un aumento del contenido total de GG a nivel de la mucosa intestinal, plasma y cerebro, respecto al grupo control, produciéndose el mayor aumento en la mucosa y el menor en el cerebro. En la mucosa intestinal constatan un aumento de GD<sub>3</sub> y GQ<sub>1a</sub>, y una disminución de GM<sub>3</sub>, mientras que en cerebro no observan modificaciones en los contenidos individuales de GG entre los dos grupos de ratas estudiadas, hecho que atribuyen a la duración del estudio. En un segundo estudio, realizado en condiciones similares, observan un aumento del 50% del contenido total de GG en los microdominios de la membrana del enterocito, con un incremento de GD<sub>3</sub> y disminución de GM<sub>3</sub> respecto al control (Park *et al.*, 2005b). Por último, en un tercer estudio con condiciones similares, constatan, en retina de ratas, un aumento del 39% del contenido total de GG, siendo el que más aumenta GD<sub>3</sub> (13%) (Park *et al.*, 2005c).

En humanos también se ha estudiado la BD del Sia y los GG. Tram *et al.* (1997) evalúan la concentración de Sia en saliva de recién nacidos (5 meses postparto) alimentados con LH o PL. Los recién nacidos alimentados con LH tienen, aproximadamente, el doble de Sia libre, un 32% más de Sia total y un 23% más de Sia ligado a otros componentes, que los alimentados con PL.

Posteriormente, el mismo grupo (Wang *et al.*, 2003), estudian las diferencias de GG y glicoproteínas conteniendo Sia, en cortex cerebral de recién nacidos fallecidos por muerte súbita, alimentados con LH y PL. Sólo encuentran una correlación positiva entre la concentración de glicoproteínas o GG y la edad de la muerte en niños alimentados con LH. Además, este grupo de recién nacidos presentan concentraciones de glicoproteínas con Sia y GG cerebrales superiores (22 y 32%, respectivamente), a los alimentados con PL. En ambos estudios atribuyen las diferencias al mayor contenido de Sia y GG de la leche materna vs. PL, si bien en ningún caso indican datos precisos de la cantidad de Sia y GG que ingieren los sujetos de los estudio.

Tangvoranuntakul *et al.* (2003) evalúan en adultos sanos la absorción de Neu5Gc; detectan un aumento en el contenido de Neu5Gc en la mucina salivar, 48 horas después de la administración de 140 mg de éste junto a una dieta vegetariana.

- Métodos *in vitro*

Engfer *et al.* (2000) realizan un ensayo de digestión intestinal *in vitro* con pancreatina porcina, partiendo del digerido gástrico de LH, obtenido por aspiración a nivel duodenal; tras los estudios por espectroscopía de masas

(MALDI-MS) concluyen que el Sia no llega a liberarse de los oligosacáridos de los que forma parte y que el contenido total de Sia no experimenta disminución alguna. Por su parte, otro autor (Newburg, 1999), comprueba que se produce una liberación del Sia, a nivel colónico, tras un proceso de fermentación.

Se han realizado estudios de *bioaccesibilidad* de GG con patrones (Kawakami *et al.*, 1994). Se encuentra que al disminuir el pH (4 a 1,3), tanto con HCl, como con jugos gástricos procedentes de aspirados de humanos, disminuyen los contenidos de GM<sub>3</sub> y de GD<sub>3</sub>; el GM<sub>3</sub> al hidrolizarse se transforma en su totalidad en LacCer, mientras que la hidrólisis de GD<sub>3</sub> da lugar a una lactona de este GG y a LacCer. Al incubar los patrones de GM<sub>3</sub> y de GD<sub>3</sub> a pHs neutros (6,3-7,4), simulando las condiciones de la etapa intestinal observan una recuperación de GD<sub>3</sub> a partir de sus lactonas.

Los estudios conocidos hasta el momento en los que se evalúa la BD de Sia y GG utilizando células Caco-2 se han realizado con disoluciones patrón.

Bardor *et al.* (2005) evalúan si la exposición de células Caco-2 a disoluciones de Neu5Ac, Neu5Gc y Manosa-Neu5Gc (intermediario de la síntesis de Neu5Gc), a una concentración 3mM, durante 24 o 72 horas incrementa el contenido de Neu5Gc en dichas células. La adición de Neu5Ac, no induce el incremento de Neu5Gc en el cultivo celular. El Neu5Gc, y su precursor, inducen un aumento del 60%. En el citosol el aumento del Neu5Gc es del 65 y 70% tras la exposición a Neu5Gc y a Manosa-Neu5Gc, respectivamente y en las membranas celulares del 43 y el 59%, respectivamente. Estos resultados indican que el incremento de

Neu5Gc a nivel de enterocito se debe a un mecanismo de absorción, y no de biotransformación del Neu5Ac. También encuentran que este hecho no es exclusivo del tejido intestinal, ya que en cultivos de fibroblastos y neuroblastomas obtienen los mismos resultados.

El transporte y absorción de GG se ha estudiado en membranas biológicas que no incluyen el epitelio intestinal (Saqr *et al.*, 1993; Schawrzmann, 2001). La captación y el transporte de los GG a través de las membranas celulares se realiza por difusión (pasiva o activa) o endocitosis. Para que se produzca el transporte por difusión, es necesario romper las micelas que forman los GG en disolución, mientras que por endocitosis se transporta la micela completa. También se comprueba que la absorción es dependiente del tiempo y de la concentración (Schawrzmann, 2001). Los GG en forma de micelas, absorbidos por endocitosis, pueden pasar al plasma sanguíneo, incorporarse al aparato de Golgi para la formación de otros GG, y/o ser transportados desde los endosomas a los lisosomas, para su degradación a mediadores bioactivos destinados a la síntesis de nuevos GG (Pagano, 1990).

Sólo se conoce un trabajo (Schnabl *et al.*, 2009b) en el que se estudia la captación, retención, transporte y metabolización del GD<sub>3</sub>, por células Caco-2. Evalúan concentraciones de GD<sub>3</sub> similares a las de la LH madura (5 y 10 mg/L), exponiendo a estas concentraciones tanto la membrana apical (simulación vía apical) como la basolateral (simulación vía intravenosa) del cultivo celular, durante 6, 24 y 48 horas. Comprueban que la captación de GD<sub>3</sub> es dependiente del tiempo, siendo, a nivel apical, la captación rápida y lineal durante las 6 primeras horas (44%), decayendo el ritmo de captación,

hasta estabilizarse entre las 24 (62%) y 48 horas (60%). A nivel basolateral se observa la misma tendencia, pero la captación total, a los tres tiempos estudiados, es mayor que a nivel apical, (74, 82, 86% a las 6, 24 y 48 horas, respectivamente). Observan una relación dosis-respuesta en la captación de GD<sub>3</sub>. Este hecho indica que los mecanismos de transporte pueden ser activo y pasivo, dependiente del gradiente de concentración. Un 96% del GD<sub>3</sub> captado a nivel apical durante las 6 primeras horas, se metaboliza, mientras que a las 24 horas sólo se metaboliza un 32%. A nivel basolateral se sigue la misma tendencia, pero a las 24 horas el GD<sub>3</sub> es completamente metabolizado.

De los trabajos que se han realizado hasta el momento, se puede considerar que la BD del Sia y los GG está determinada principalmente por: su estructura química, tamaño molecular, grado de polimerización del Sia, hidrofobicidad, solubilidad, glicosilación/acilación, matriz en que se encuentren, otros componentes de la dieta, así como de factores biológicos como el tránsito gástrico e intestinal, el pH del lumen, la permeabilidad de membrana, y la excreción biliar. La gran variabilidad de este grupo de sustancias, así como su bajo contenido dificultan el estudio de su BD.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

## 1. Descripción de muestras

Se analizan 12 preparados destinados a la alimentación de lactantes, comercializados en España y procedentes de 4 empresas elaboradoras. A lo largo del trabajo se nombran con tres caracteres, el primero hace referencia al fabricante, el segundo sustituye al nombre comercial, y el tercero nos indica si la muestra es un PL (1), PC (2), preparado sin lactosa (3), preparado parcialmente hidrolizado (4) o preparado extensamente hidrolizado (5).

También se analizan sueros lácteos, ingredientes de algunos de los preparados descritos anteriormente. El suero SA está elaborado a base de  $\alpha$ -lactoalbúmina, y el SB a base de membranas de los glóbulos grasos de la leche (MFGM).

La descripción de las muestras objeto de estudio se muestran en los cuadros nº 14 y 15.

Los preparados Ac1 y Ad1 no se encuentran comercializados.

Junto con los preparados y los sueros se analiza una mezcla de LH madura (meses 4 a 7), donada por una voluntaria sana.

**Cuadro n° 14.** Muestras analizadas. Energía y macronutrientes (datos del etiquetado).

Nombre	Energía (Kcal/100mL)	Proteínas (g/100mL)	Caseína/Suero	Carbohidratos (g/100mL)	Grasas (g/100mL)
Aa1	67	1,3	50:50	7,4	3,6
Ab1	67	1,4	50:50	7,0	3,8
Ac1	--	--	40:60	--	--
Ad1	--	--	40:60	--	--
Aa2	68	1,7	50:50	7,5	3,5
Ab2	69	1,7	50:50	7,9	3,5
Ac2	84	2,2	40:60	12,1	2,8
Ba3	66	1,3	100:0	7,3	3,5
Ba4	66	1,4	40:60	7,0	3,6
Ba5	66	1,6	0:100	7,1	3,5
Ca3,5	68	1,9	100:0	6,9	3,8
Da5	68	1,9	40:60	8,3	3,1
SA (g/100g)	-	85	0:100	9	2
SB (g/100g)	-	72	0:100	2	18

1 PL, 2 PC, 3 sin lactosa, 4 parcialmente hidrolizado, 5 extensamente hidrolizado.

**Cuadro n° 15.** Muestras analizadas. Ingredientes y formato.

<b>Muestra</b>	<b>Composición</b>
Aa1	<p>Suero lácteo desmineralizado, aceites vegetales, leche descremada, lactosa, minerales, lecitina, vitaminas, colina, taurina, inositol, carnitina y aminoácidos. FC: 13%.</p> <p>Formato: Polvo comercializado en bote de 900g, almacenado en congelación hasta el análisis.</p>
Ab1	<p>Suero lácteo desmineralizado, aceites vegetales, leche descremada, lactosa, grasa láctea, <b>proteínas de suero lácteo desmineralizado enriquecidas en <math>\alpha</math>-lactoalbúmina (SA)</b>, fosfolípidos de huevo, minerales, lecitina, aminoácidos, vitaminas, aceite de pescado, colina, taurina, inositol, nucleótidos y carnitina. FC: 13%.</p> <p>Formato: Polvo comercializado en bote de 900g, almacenado en congelación hasta el análisis.</p>
Ac1	<p>No comercial, <b>contiene suero lácteo a base de MFGM (SB)</b>. FC: 13%.</p>
Ad1	<p>No comercial. FC: 13%.</p>
Aa2	<p>Maltodextrina, aceites vegetales, leche descremada, <b>suero lácteo desmineralizado</b>, minerales, lactosa, lecitina, vitaminas, colina, taurina, inositol y carnitina. FC: 13 %.</p> <p>Formato: Polvo comercializado en bote de 900g, almacenado en congelación hasta el análisis.</p>

**Cuadro n° 15 (continuación).** Muestras analizadas. Ingredientes y formato.

<b>Muestra</b>	<b>Composición</b>
Ab2	<p>Maltodextrinas, aceites vegetales, leche desnatada, <b>SA</b>, galacto-oligosacáridos, minerales, fructo-oligosacáridos, lactosa, lecitina, vitaminas, fermentos lácticos, colina, taurina, inositol, nucleótidos y carnitina FC: 14%.</p> <p>Formato: Polvo comercializado en bote de 900g, almacenado en congelación hasta el análisis.</p>
Ac2	<p>Leche de continuación 90% (yogurt desnatado pasteurizado después de la fermentación, leche desnatada en polvo, lactosa, aceites vegetales, <b>SB</b>, almidón de arroz, fructo-oligosacáridos, lecitina de soja, vitaminas, sales minerales de hierro y calcio, nucleótidos), zumo de fresa a base de concentrado (4%), azúcar, concentrado de zanahoria y grosella, estabilizante (pectina), acidulante (ácido cítrico) y aromas naturales.</p> <p>Formato: líquido en envase de plástico de 100 mL. Se almacena liofilizado, en congelación hasta el análisis.</p>
Ba3	<p>Jarabe de glucosa, aceites vegetales, <b>caseinato de leche</b>, minerales, taurina, aceite de pescado, lecitina de soja, cloruro de colina y vitaminas. FC: 12,8%.</p> <p>Formato: Polvo comercializado en bote de 400g, almacenado en congelación hasta el análisis.</p>

**Cuadro n° 15 (continuación).** Muestras analizadas. Ingredientes y formato.

<b>Muestra</b>	<b>Composición</b>
Ba4	Jarabe de glucosa, aceites vegetales, proteínas lácteas, <b>concentrado de seroproteína procedente de leche, seroproteína desmineralizada de origen lácteo</b> , minerales, vitaminas y cloruro de colina. FC: 13,6%. Formato: Polvo comercializado en bote de 400g, almacenado en congelación hasta el análisis.
Ba5	<b>Concentrado de hidrolizado de seroproteína láctea, dextrinomaltosa</b> , aceites vegetales, galacto-oligosacáridos lácteos, polifruktosa, minerales, vitaminas, cloruro de colina y nucleótidos. FC: 12,7%. Formato: Polvo comercializado en bote de 400g, almacenado en congelación hasta el análisis.
Ca3,5	Jarabe de glucosa, aceites vegetales, <b>caseína extensamente hidrolizada</b> , almidón de maíz modificado, dextrosa, cloruro de colina, maltodextrina, citratos y vitaminas. FC: 13,5%. Formato: Polvo comercializado en bote de 400g, almacenado en congelación hasta el análisis.
Da5	Dextrinomaltosa, aceites vegetales, <b>hidrolizado de suero, hidrolizado de caseína</b> , triglicéridos de cadena media, sales minerales, lecitina de soja, complejo vitamínico, taurina, L-carnitina y antioxidantes. FC: 15,7%. Formato: Polvo comercializado en bote de 400g, almacenado en congelación hasta el análisis.

FC: Porcentaje de reconstitución.

## ***METODOLOGÍA***

## **2. Determinación de ácido siálico**

La determinación del Sia total en PL, PC y LH requiere una liberación de los lípidos y proteínas a los que puede estar unido, mediante una hidrólisis ácida, seguida de una etapa de purificación, para eliminar otros glúcidos, y determinación por EAM o HPLC.

### **2.1 Hidrólisis (Svennerholm, 1958)**

Se disuelven 0,75 g de muestra en polvo, o del liofilizado correspondiente en muestras líquidas, en 10 mL de agua desionizada. Se toman 0,9 mL y se hidrolizan con 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M, calentando a 80°C durante 60 minutos en un bloque calefactor. Tras la hidrólisis, las muestras se atemperan para continuar con el análisis, o pueden conservarse a 4°C durante un tiempo indefinido, siempre y cuando no se quiera identificar la forma Neu5Gc, en cuyo caso únicamente se pueden almacenar durante 24 horas.

### **2.2 Purificación**

El método de purificación descrito por Svennerholm (1958) utiliza una resina Dowex 2x8 que actualmente se encuentra descatalogada, por lo que se ensayan dos resinas, la Dowex 1x8 y la Marathon A2. En primer lugar se deben activar del siguiente modo, 5 g de resina se resuspenden en 30 mL de HCl 2N, se calientan al baño maría durante 30 minutos, se deja enfriar y se descarta el sobrenadante (se repite el mismo proceso 4 veces más). A continuación se lava la resina dos veces con 60 mL de agua desionizada durante 10 minutos cada vez. Sobre la resina tratada se añaden

60 mL formiato sódico 2N y se mantienen 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se repite el proceso 3 veces más, en el último lavado se debe comprobar que el sobrenadante tiene pH neutro, si no es así se debe seguir lavando con formiato sódico. Para concluir se adicionan 60 mL de ácido fórmico 1N, manteniéndolos hasta que sedimente la resina, se elimina el sobrenadante y se vuelve a repetir la operación una vez más. La resina activada se resuspende en 30 mL de agua desionizada para su conservación a 4°C hasta su uso (en estas condiciones puede mantenerse hasta dos meses).

La muestra hidrolizada se centrifuga (200xg, 5 minutos, 4°C), y el sobrenadante se pasa por una columna de policarbonato conteniendo 2 mL de resina, por la que previamente se han pasado 20 mL de ácido fórmico 0,1N. Seguidamente se lava la columna con 20 mL de agua, y se eluye el Sia con 20 mL de ácido fórmico 1N. Se reservan 400 µL para la determinación cromatográfica, y el resto se liofiliza para determinación espectrofotométrica.

La resina utilizada para la purificación puede regenerarse, hasta tres veces. Para regenerar 2 mL de resina se pasan por el siguiente orden 10 mL de: NaOH (2N), agua, formiato sódico (2N) y ácido fórmico (0,1N). La resina regenerada se conserva en la propia columna a 4°C.

### **2.3 Determinación por espectrofotetría (Svennerholm, 1958)**

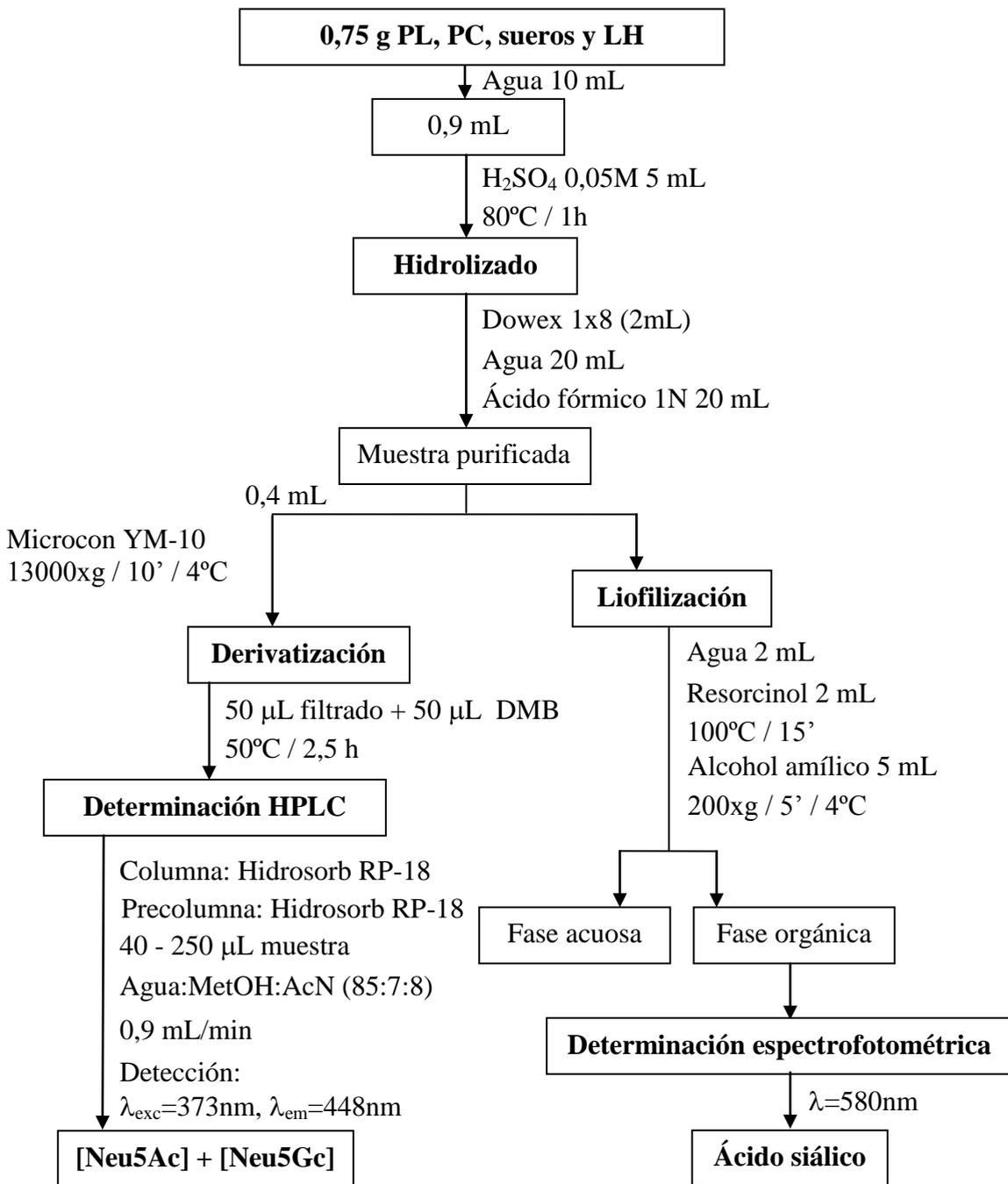
La muestra liofilizada se reconstituye en 2 mL de agua desionizada, se le añaden 2 mL de reactivo de resorcinol y se mantiene a 100°C durante 15 minutos (en un bloque calefactor), protegida de la luz. Tras enfriar en un

baño de agua-hielo, se adicionan 5 mL de alcohol *N*-amílico y se deja 15 minutos en oscuridad. A continuación se centrifuga a 200xg, 5 minutos, 4°C. Se cuantifica el contenido de Sia total presente en la fase orgánica por calibración externa (Neu5Ac,  $\lambda=580$  nm). En la figura nº 10 se muestra un esquema del proceso.

#### **2.4 Determinación por HPLC (Martín *et al.*, 2007)**

El método permite diferenciar dos formas de Sia, el Neu5Ac y el Neu5Gc. 400  $\mu$ L de muestra hidrolizada y purificada se pasan a través de filtros Microcon YM-10 (13000xg, 10 minutos, 4°C). Se añaden 50  $\mu$ L de reactivo derivatizante DMB a 50  $\mu$ L del filtrado y se calientan a 50°C 2,5 horas en bloque calefactor, protegido de la luz.

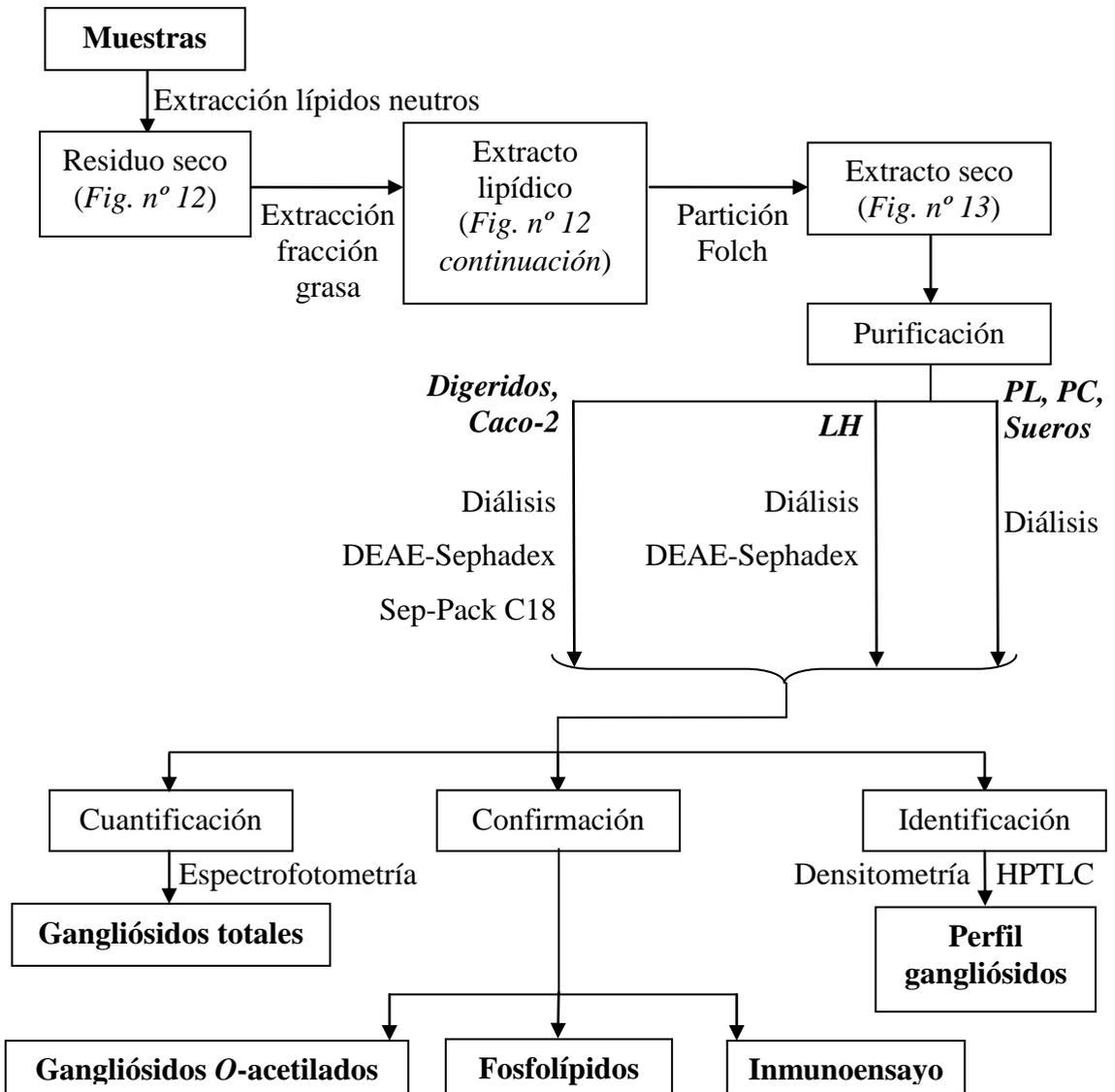
El análisis de HPLC se lleva a cabo en el sistema Waters descrito en el apartado de instrumentación. Se usa una columna Hidrosorb RP-18 (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm) con precolumna homónima de 5  $\mu$ m. Como fase móvil se utiliza la mezcla agua:metanol:acetonitrilo (85:7:8) (v/v/v), pasando a un flujo de 0,9 mL/min. La columna se mantiene a 33°C. La detección se realiza con un  $\lambda_{exc}= 373$  nm  $\lambda_{em}= 448$  nm, ganancia 1, atenuación 64 y respuesta 5s. La cantidad de muestra inyectada oscila entre 40 y 250  $\mu$ L atendiendo a la naturaleza de la muestra objeto de análisis. En estas condiciones el pico correspondiente al Neu5Gc eluye alrededor de los 9 minutos y el Neu5Ac a los 12 minutos. En la figura nº 10 se muestra un esquema del proceso. La cuantificación se realiza por calibración externa, utilizando patrones de Neu5Ac (de 12,5 a 250 ng) y Neu5Gc (de 1 a 5 ng).



**Figura n° 10.** Determinación de ácido siálico.

### 3. Determinación de gangliósidos

En la figura n° 11 se muestra un esquema general del proceso de extracción, purificación y determinación de GG.



**Figura n° 11.** Determinación general de gangliósidos.

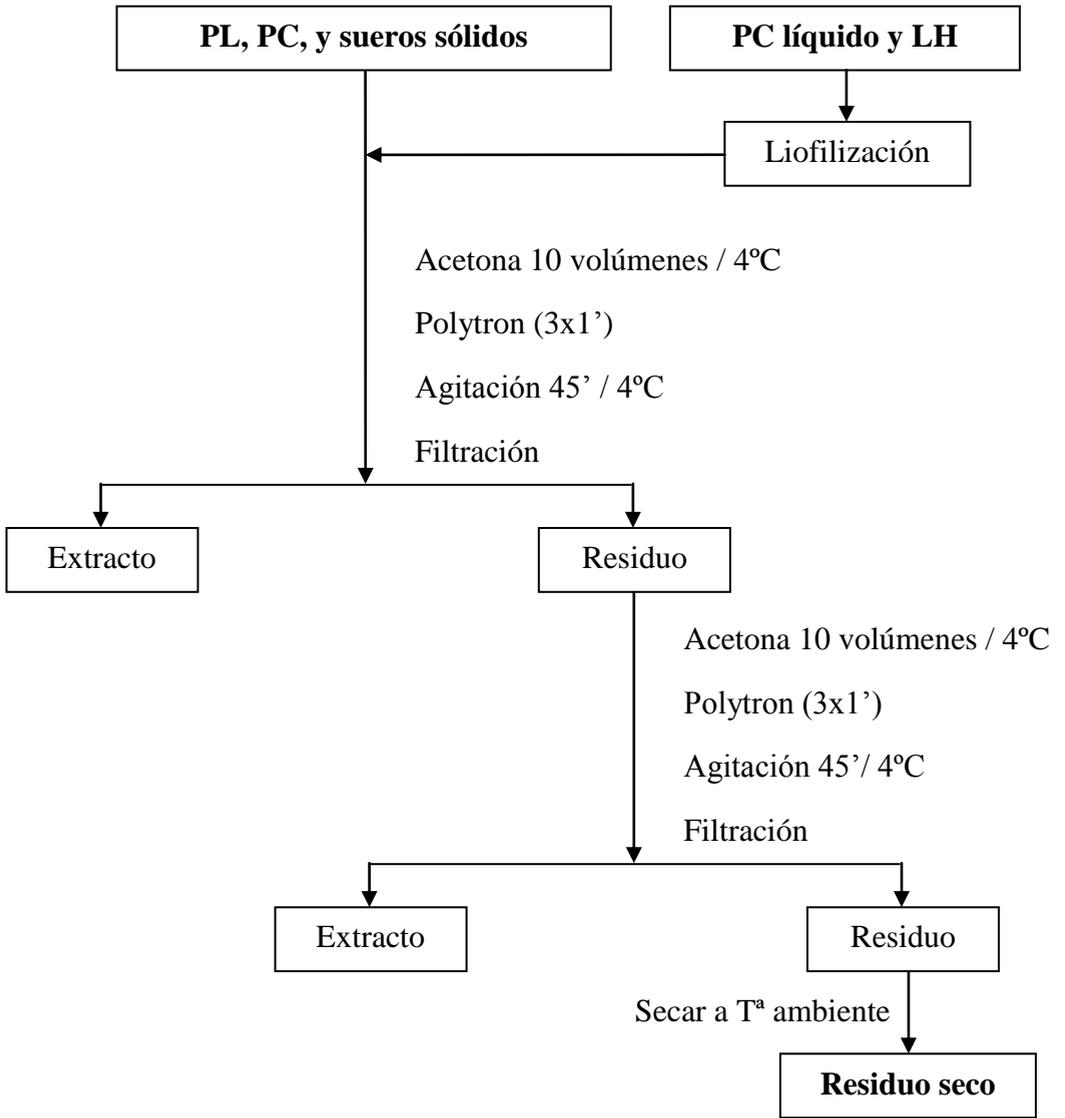
### **3.1 Extracción**

#### **3.1.1 Extracción de la fracción grasa (Puente *et al.*, 1992)**

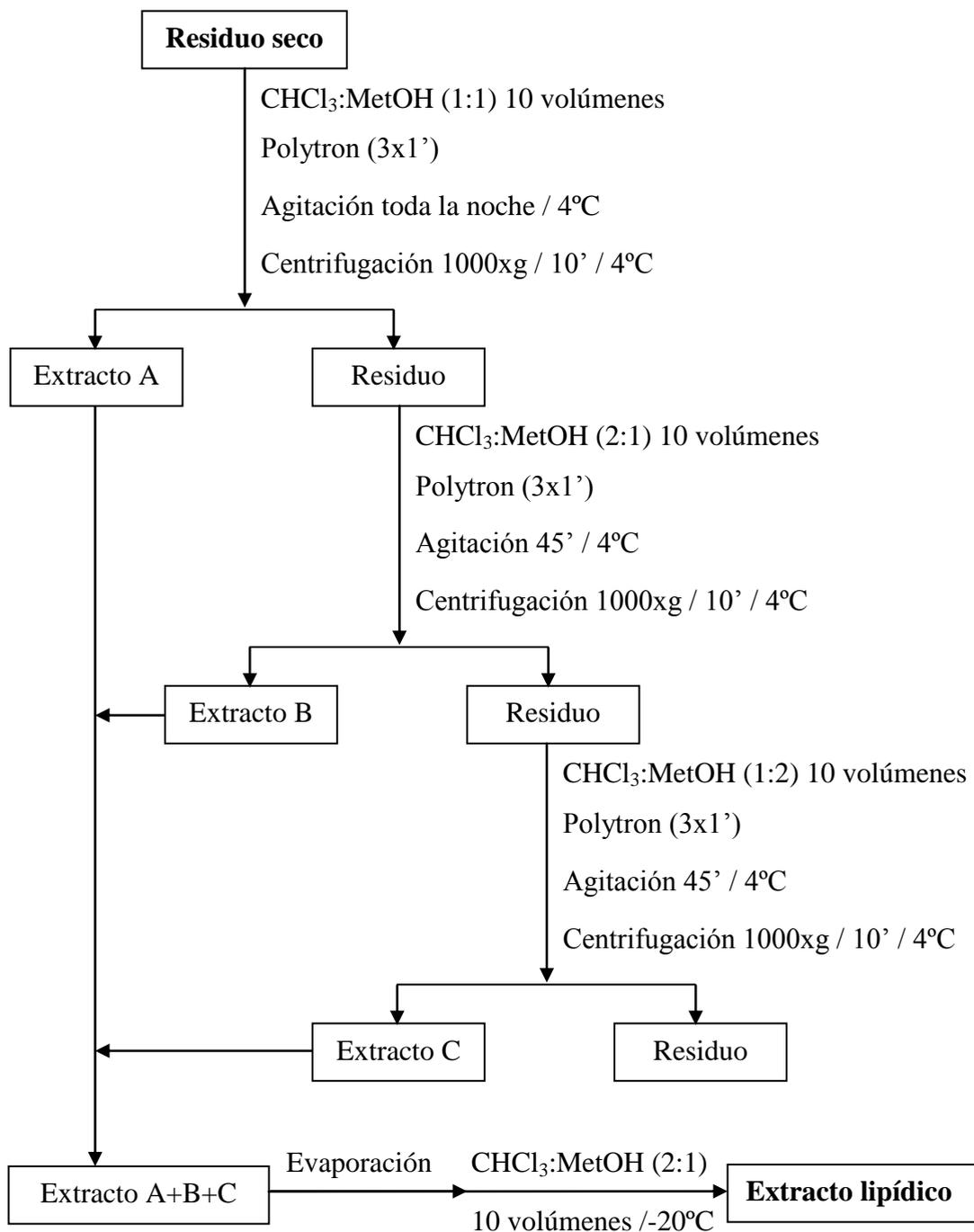
Se comienza con la eliminación de los lípidos neutros, fundamentalmente triacilgliceroles/triglicéridos, lavando con acetona fría (-20°C). Se pesa alrededor de 5 g de muestra (que se corresponden con 200-300 µg de GG/peso seco), que se resuspenden en 10 volúmenes de acetona a (-20°C), respecto al peso de muestra. La muestra resuspendida se homogeneiza con ayuda de un Polytron (1 minuto x 3) con interrupciones de 1 minuto. A continuación se mantiene 45 minutos en agitación, con agitador magnético, a 4°C. Se pasa a través de filtros de fritas cerámicas, y se procede a una nueva extracción del sólido. El residuo se deja secar durante toda la noche a temperatura ambiente (ver figura n° 12).

El residuo se resuspende con ayuda del Polytron en 10 volúmenes, respecto al peso seco inicial de muestra, de CHCl<sub>3</sub>:MetOH (1:1) (v/v) aplicando las condiciones descritas anteriormente. Se deja en agitación, con agitador magnético, durante toda la noche a 4°C.

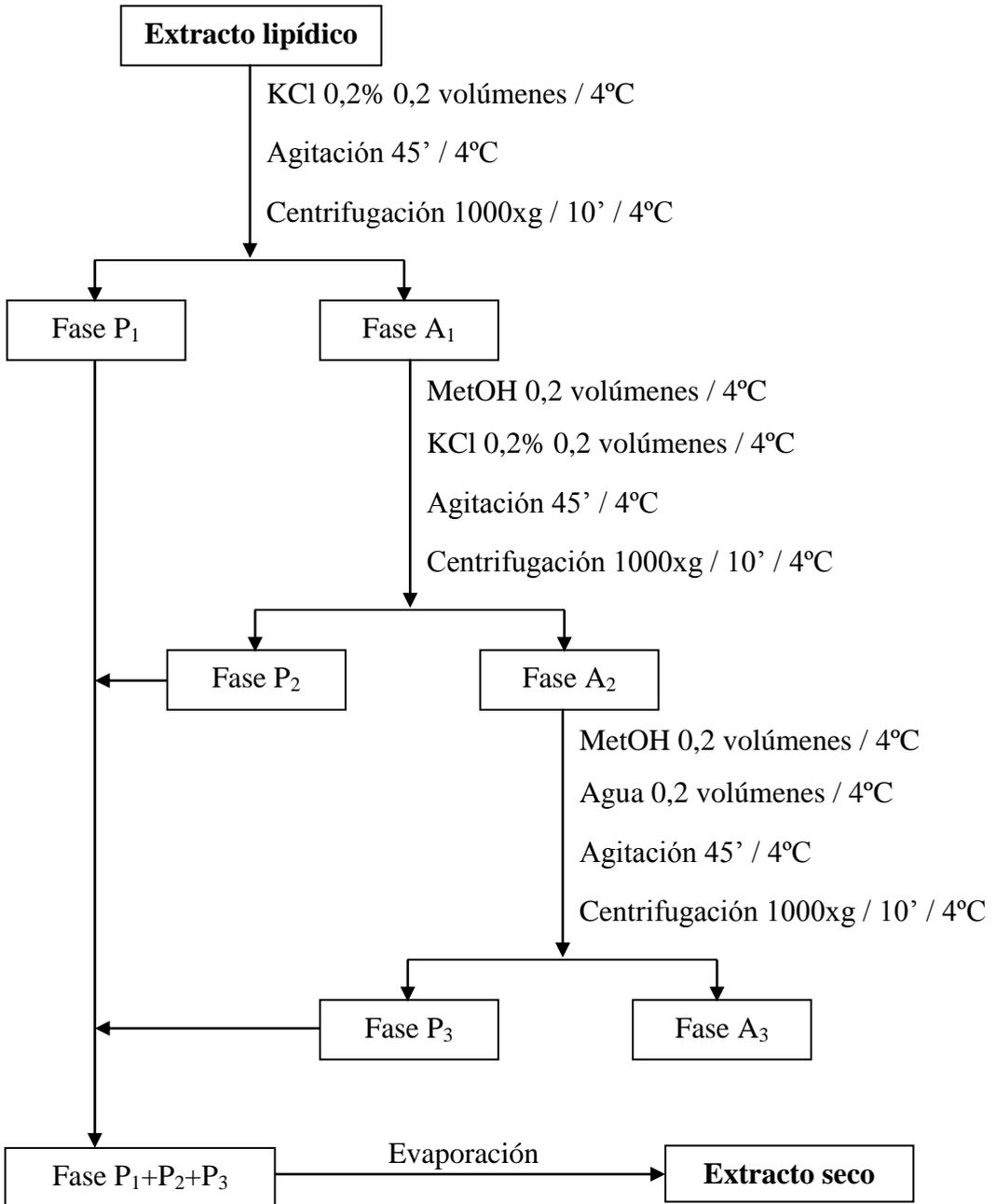
Se centrifuga a 1000xg, 4°C, 10 minutos, y se recoge el residuo manteniéndolo a 4°C. El residuo se extrae dos veces (ver figura n° 12 continuación) con 10 volúmenes de CHCl<sub>3</sub>:MetOH (2:1) y (1:2) (v/v), sucesivamente, con ayuda del Polytron y el agitador magnético durante 45 minutos a 4°C. Se reúnen los extractos, se evaporan y redisuelven en 10 volúmenes de CHCl<sub>3</sub>:MetOH (2:1) (v/v) y se conserva a -20°C.



**Figura n° 12.** Determinación de gangliósidos: extracción de la fracción grasa.



**Figura n° 12 (continuación).** Determinación de gangliósidos: extracción de la fracción grasa



**Figura n° 13.** Determinación de gangliósidos: partición de Folch

### **3.1.1 Partición de Folch**

El extracto graso, mantenido al menos 4 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se centrifuga a  $1000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos. Todos los reactivos se mantienen a  $4^{\circ}\text{C}$  y las distintas etapas se realizan a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al sobrenadante se le añaden 0,2 volúmenes de KCl al 0,2%, se mantiene 45 minutos en agitador magnético y se centrifuga a  $1000\times g$ , 10 minutos. La fase inferior (fase apolar,  $A_1$ ) se extrae nuevamente con 0,2 volúmenes de MetOH y 0,2 volúmenes de KCl 0,2% (fase  $A_2$ ) y posteriormente con 0,2 volúmenes de MetOH y 0,2 volúmenes de agua (fase  $A_3$ ). Las tres fases polares ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) se reúnen y se llevan a sequedad (Vanier *et al.*, 1971) (ver figura nº 13).

## **3.2 Purificación**

### **3.2.1 Diálisis**

El extracto seco obtenido del sistema de particiones de Folch se resuspende en 3 mL de agua a  $4^{\circ}\text{C}$  y se introduce en una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 3500 de peso molecular de corte (MWCO). Se trabaja a  $4^{\circ}\text{C}$  para favorecer la agregación de los GG y evitar su difusión fuera de la membrana. Se deja dializando frente a agua desionizada durante dos días, con cambios de agua cada 8 horas. Transcurrido este tiempo, el contenido de dentro de la membrana se liofiliza. Este liofilizado, en el caso de muestras sometidas a procesos de digestión gastrointestinal simulada y de células Caco-2, debe purificarse por cromatografía en DEAE-Sephadex y extracción en fase sólida.

### **3.2.2 Cromatografía en DEAE-Sephadex**

La muestra sometida a diálisis se purifica mediante el paso por una resina de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex) (Colarow *et al.*, 2003). Para la activación de la resina, 10 g de ésta se lavan tres veces con 140 mL de CHCl<sub>3</sub>:MetOH:acetato sódico 0,8M (30:60:8) (v/v/v), y se deja toda la noche con una cantidad mínima de la misma mezcla. Al día siguiente, se lava 4 veces con 140 mL de CHCl<sub>3</sub>:MetOH:agua (30:60:8) (v/v/v).

Se pasan 20 mL de la mezcla CHCl<sub>3</sub>:MetOH:agua (30:60:8) (v/v/v) por la columna conteniendo 10 mL de resina. Se pasa la muestra, previamente disuelta en 5 mL de CHCl<sub>3</sub>:MetOH:agua (30:60:8) (v/v/v), a razón de 1mL/minuto. Posteriormente se lava con 75 mL de CHCl<sub>3</sub>:MetOH:agua (30:60:8) (v/v/v). La elución se realiza con 65 mL de CHCl<sub>3</sub>:MetOH:acetato sódico 0,8M (30:60:8) (v/v/v).

El eluido se lleva a sequedad y se dializa según metodología indicada en el apartado 3.2.1.

### **3.2.3 Extracción en fase sólida con cartuchos Sep-Pack C18**

Los cartuchos se acondicionan con 60 mL de MetOH, 60 mL de CHCl<sub>3</sub>:MetOH (1:2) (v/v) y concluyendo con otros 60 mL de MetOH, sucesivamente. La muestra, disuelta en MetOH:agua (1:1) (v/v), se pasa por el cartucho y el eluido se vuelve a pasar por la columna. A continuación se lava con 25 mL de agua y se eluye con 25 mL de MetOH seguidos de 25 mL de la mezcla CHCl<sub>3</sub>:MetOH (1:2) (v/v). El eluido se lleva a sequedad.

La mezcla de GG obtenida se resuspende en 1 mL de CHCl<sub>3</sub>:MetOH (2:1) (v/v) y se conserva a -20°C hasta el análisis (Williams y McCluer, 1980).

### **3.3 Determinación del contenido total (Puente *et al.*, 1992)**

Brevemente, a 10µL de la muestra purificada, evaporada con N<sub>2</sub> y redisolta en 500µL de agua, se le añaden 500µL de reactivo de resorcinol.

Se incuba la muestra en bloque calefactor a 100°C, 15 minutos. Se para la reacción sumergiendo los tubos en un baño de agua-hielo. A cada tubo se le adiciona 1mL de acetato de tertbutilo:butanol (85:15), se centrifuga (1000xg, 10 min, 4°C) y se mide la absorbancia de la fase orgánica a 580nm.

Paralelamente se preparan 2 blancos y tres patrones de Neu5Ac de 5, 10 y 15 µg.

Los resultados se expresan como ASUL.

### **3.4 Determinación del perfil individual**

Los GG se separan por HPTLC y el porcentaje relativo se obtiene por densitometría óptica (Puente *et al.*, 1992). La fase móvil utilizada es de CHCl<sub>3</sub>:MetOH:CaCl<sub>2</sub> 0,2% (p/v) en proporciones 50:45:10 (v/v/v). En una placa de HPTLC (base de vidrio, 10x10 cm) se siembra un volumen de muestra purificada que debe contener de 2 a 3 µg de GG. Paralelamente se siembra un patrón conteniendo GG de cerebro bovino (GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>, GT<sub>1b</sub> y GQ<sub>1b</sub>) y GM<sub>3</sub>. La placa se revela con reactivo de resorcinol, se cubre

con un vidrio y se mantiene en placa calefactora a 100°C durante 15 minutos. La medida se realiza por densitometría a 580 nm. Otros parámetros, como la longitud y anchura del “zig-zag” de barrido se programan atendiendo a la longitud de la banda del depósito y la resolución entre bandas próximas.

### **3.5 Pruebas de confirmación**

La presencia de ciertos interferentes puede hacer que los GG no se resuelvan por HPTLC. En estos casos se precisan algunas pruebas confirmatorias.

#### **3.5.1 Identificación de gangliósidos *O*-acetilados**

Los GG *O*-acetilados se hidrolizan en condiciones alcalinas (Sonnino, 1983). Sobre una placa de HPTLC (base de vidrio, 10x10 cm) se siembra la muestra y se expone a una atmósfera amoniacal durante 5 horas. Después de secarse, sobre la misma placa, se siembra de nuevo la muestra y se desarrolla con la fase móvil descrita en el apartado 3.4. Tras revelar con reactivo de resorcinol, la desaparición de una banda en el depósito expuesto a amoníaco indica que ésta corresponde a un GG *O*-acetilado.

#### **3.5.2 Identificación de fosfolípidos**

Los fosfolípidos a pesar de las purificaciones, pueden extraerse junto con la fracción de GG, llegando a enmascarar algunas bandas de éstos.

Para su identificación se prepara una placa de HPTLC de la forma indicada en el apartado 3.4 y se revela con Phospray comercial. Los fosfolípidos adquieren un color azul claro característico que desaparece a las 24-48 horas (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009).

### **3.5.3 Inmunoensayo**

En estos ensayos se han utilizado los anticuerpos anti-GM<sub>1</sub> y anti-Neu5Gc.

Se prepara una placa de HPTLC con base de aluminio y recubrimiento de sílice 60 (10 x 6 cm), dividida en dos zonas: química e inmunoensayo, en las que se siembra a razón de 3 µg y 2 µg de GG, respectivamente. Tras el desarrollo de la placa, la zona química se revela con reactivo de orcinol (las bandas moradas corresponden a GG y glicolípidos neutros), la zona de inmunoensayo se recubre con polibutilisometacrilato (PBIMC) al 0,1% en hexano, durante 75 segundos. Se deja secar y se bordea la sílice con PBIMC al 1% en hexano. Una vez preparada la placa se comienza con el inmunoensayo (Karlsson y Stromberg, 1987); para ello se sumerge la placa en tampón de fosfato salino (PBS) con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% (p/v) y se mantiene en agitación durante una hora. La placa se seca al aire, se cubre con la dilución de anticuerpo (1:1000) (v/v) en PBS con BSA al 2% (p/v). Se deja en contacto durante una hora. Se lava con PBS (4x5 minutos). Una vez seca la placa, se añade anti-Ig biotinilado en PBS con BSA al 2% (p/v) (1:2000) (v/v), se deja una hora en agitación y se repite el proceso de lavado anterior. A continuación se añade estreptavidina-fosfatasa alcalina disuelta en PBS con BSA al 2% (p/v) en proporción 1:1000 (v/v),

se agita una hora y se lava con PBS. Después se coloca la placa en una cubeta y se adiciona la disolución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP). Una coloración azul es indicativo de la presencia del GG correspondiente al anticuerpo utilizado.

#### **4. Ensayos de *biodisponibilidad in vitro***

##### **4.1 *Bioaccesibilidad***

El método utilizado simula el proceso de digestión gastrointestinal en sus dos etapas gástrica e intestinal (ver figura nº 14)

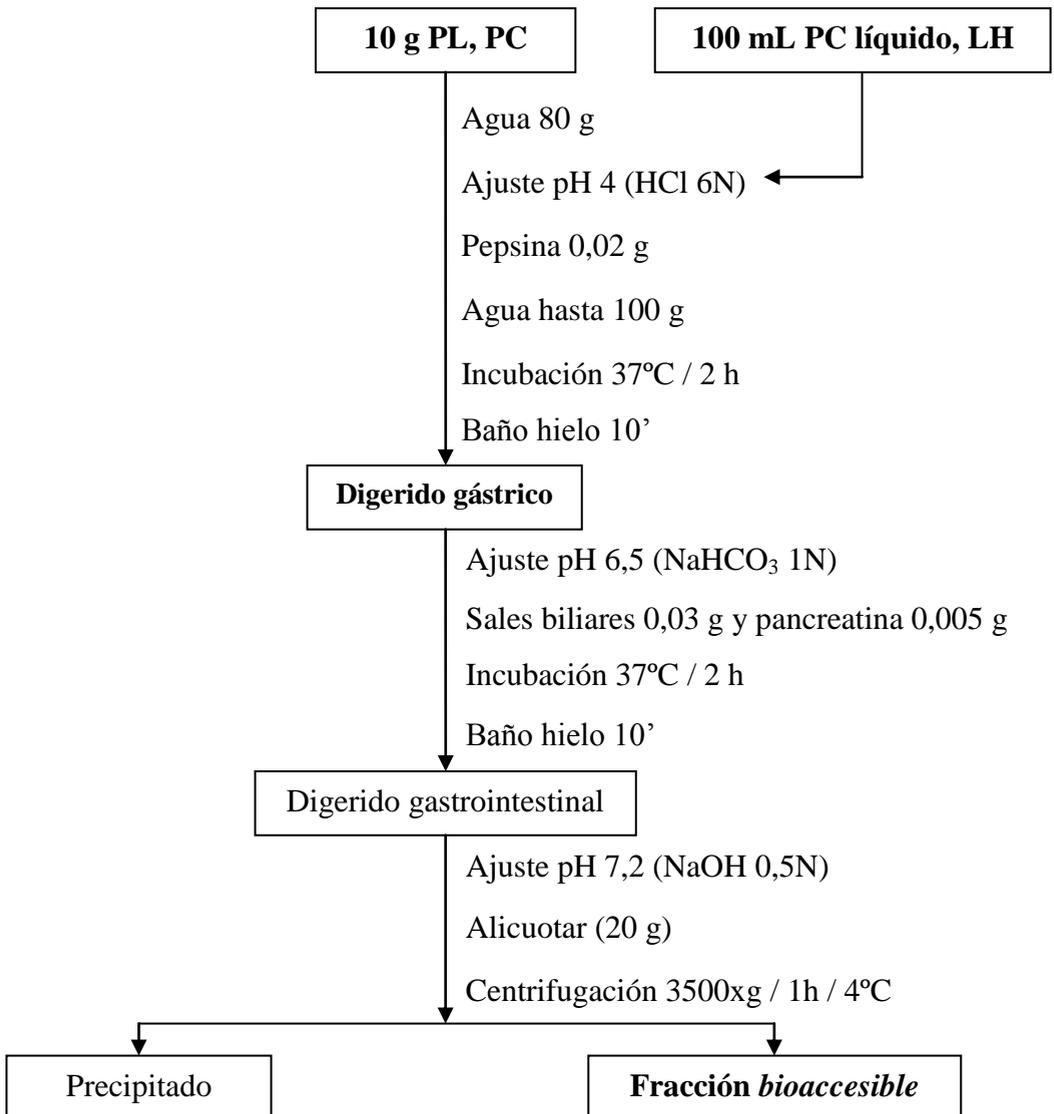
##### **4.1.1 Etapa gástrica**

En un matraz erlenmeyer se pesan 10 g de muestra a los que se les añaden 80 mL de agua (en caso de muestras líquidas 100 mL directamente). Se ajusta el pH a 4 con HCl 6N y transcurridos 15 minutos se reajusta el valor, si es necesario. Se añaden 0,02 g de pepsina y se completa a 100 g con agua desionizada. Se precinta el matraz erlenmeyer con Parafilm y se mantiene 2 horas en un baño de agua a 37°C con agitación controlada (120 golpes/minuto). Transcurrido este tiempo (con el fin de interrumpir la actividad enzimática), el digerido gástrico (DG) se sumerge en un baño de hielo durante 10 minutos.

##### **4.1.2 Etapa intestinal**

El digerido gástrico se ajusta a pH 6,5 con NaHCO<sub>3</sub> 0,1N. A continuación se adicionan 0,005 g de pancreatina y 0,03 g de extracto biliar.

El matraz erlenmeyer se precinta con Parafilm y se mantiene a 37°C durante 2 horas en un baño con agitación controlada (120 golpes/minuto). Transcurrido este tiempo se retira del baño y se sumerge en hielo durante 10 minutos.



**Figura 14.** Digestión gastrointestinal *in vitro*

Una vez finalizada la etapa intestinal, el pH se ajusta a 7,2 con NaOH 0,5N. Se pesan alícuotas de 20g del digerido intestinal (DGI) en tubos de centrífuga de propileno, de 50 ml de capacidad, y se centrifugan a 3500xg, a 4 °C durante 1 hora. Los sobrenadantes reunidos constituyen la FB, y los precipitados la fracción insoluble.

El Sia y los GG de los DG y las FB se determinan según lo indicado en los apartados 2 y 3 respectivamente, teniendo en cuenta que para la determinación de GG se parte de una mayor cantidad (10 g de digerido o FB liofilizados) y es necesario aplicar las purificaciones descritas en el apartado 3.2.

#### **4.2 Ensayos preliminares de *biodisponibilidad in vitro* (células Caco-2)**

Las células Caco-2 proceden de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; número 86010202, Salysbury, UK). Todos los cultivos se utilizan entre los pases 53 al 71.

Con el fin de abordar estudios de *biodisponibilidad* de Sia y GG, así como los efectos biológicos de GG, se determinan las concentraciones totales de Sia y GG, así como el perfil y localización de GG en células Caco-2.

Para realizar las determinaciones de Sia y GG sobre células no diferenciadas (9-11 días post-siembra) o diferenciadas (15-18 días post-

siembra) se siembran a una densidad de siembra de 50.000 células/cm<sup>2</sup> 16 o 4 frascos de 150 cm<sup>2</sup> por ensayo, respectivamente.

#### **4.2.1 Determinación de ácido siálico en células Caco-2**

Se comienza despegando las células de los frascos de cultivo, adicionando 10 ml de una disolución de tripsina – EDTA (0,25%, p/v), previamente atemperada a 37°C. Se deja actuar durante 1-2 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se elimina por aspiración. Los frascos se incuban durante 10 minutos a 37°C, en atmósfera con 95% de humedad relativa y con un flujo de CO<sub>2</sub> de 5%. Transcurrido este tiempo, se recogen las células de cada frasco resuspendiéndolas en 10 mL de medio de cultivo (DMEM).

Se centrifugan las monocapas celulares a 1500xg, 10 minutos a 4°C. Se reúnen los precipitados y se disuelven en 3 mL de agua Milli-Q. Se disgregan los tejidos celulares con el Polytron (1 minuto a potencia 2). Se reservan 50 µL de suspensión celular para la determinación de proteínas y el resto se utiliza para la determinación de Sia. Para la hidrólisis y purificación previa a la determinación de Sia se trabaja como se indica en los apartados 2.1 y 2.2, partiendo de 0,9 mL de suspensión celular. La determinación se realiza por HPLC (apartado 2.4), con ligeras modificaciones, que consisten en inyectar 250 µL de muestra derivatizada. También se introduce una etapa de lavado con agua:acetonitrilo (70:30) (v/v) tras la elución de Neu5Ac y Neu5Gc (minuto 15 a 18) para eliminar interferentes incrementando el tiempo total de análisis hasta los 30 minutos.

Las proteínas totales se determinan por el método de Lowry *et al.* (1951). Brevemente, a 50  $\mu$ L de homogeneizado celular se le adicionan 0,65 mL de agua y 2,5 mL de la mezcla de reactivos Lowry A + B, tras 10 minutos, se adicionan 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N. Tras 30 minutos se determina la absorbancia a 750 nm frente al aire. La cuantificación se realiza por calibración externa, usando como patrón BSA (10 – 140  $\mu$ g).

#### **4.2.2 Determinación del contenido y perfil de gangliósidos en células Caco-2**

Para obtener la suspensión celular se procede del mismo modo descrito en el apartado anterior utilizando un volumen total de 25 mL, de los que se reservan 50  $\mu$ L para la determinación de proteínas, y el resto se liofiliza.

A partir de todo el liofilizado se determinan los GG totales e identifican los individuales según los procedimientos descritos en los apartados 3.3 y 3.4, teniendo en cuenta que deben purificarse según lo descrito en el apartado 3.2.

#### **4.2.3 Localización de gangliósidos en células Caco-2**

Se realizan ensayos de microscopía de fluorescencia confocal para la localización de GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>, en células Caco-2 diferenciadas, basándose en el método propuesto por Park *et al.* (2005) para intestino de rata aislado. Se realiza una siembra de células Caco-2 en placas de microscopía de 8

pocillos ( $0,8 \text{ cm}^2/\text{pocillo}$ ), con una densidad de siembra de  $50.000 \text{ células/cm}^2$ . Se retira el DMEM y se adicionan  $100 \text{ }\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de PBS con BSA al 2 % (p/v) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se adicionan  $100 \text{ }\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de anti-GM<sub>3</sub> o anti-GD<sub>3</sub> (1:500, v/v con PBS) y se mantienen 2 horas. Se lava la monocapa con PBS a 4°C (10 minutos x 3), se adicionan  $100 \text{ }\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (1:6000, v/v con PBS) para GM<sub>3</sub> o GD<sub>3</sub>, respectivamente. Se mantiene 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se lava la monocapa de nuevo con PBS a 4°C (10 minutos x 3). Se observan con el microscopio confocal, en el que se opera a unas longitudes de onda de excitación de 490 y 480 nm, y de emisión de 514 y 578 nm para FITC y ficoeritrina, respectivamente.

#### **4.2.4 Efecto de los gangliósidos sobre la viabilidad de células Caco-2.**

La viabilidad celular, tras la incubación con patrones de GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub> se determina mediante tinción con azul tripán para evaluar la integridad de membrana celular, ya que este colorante sólo penetra en las células muertas/no viables. Se siembran las células en placas de 24 pocillos ( $2,01 \text{ cm}^2/\text{pocillo}$ ) con una densidad de siembra de  $50.000 \text{ células/cm}^2$ ; se retira el medio de cultivo a los 15 días post-siembra. Se adiciona a cada pocillo 1 mL de DMEM conteniendo la cantidad de patrón de GG a ensayar. Paralelamente se preparan células control. Se incuban a 37°C (95% humedad, 5% CO<sub>2</sub>) durante diferentes tiempos (2 y 24 horas). Las células se despegan con  $0,5 \text{ mL}/\text{pocillo}$  de disolución tripsina-EDTA (0,25%, p/v), se

incuban 10 minutos, y se resuspenden en 0,5 mL/pocillo de DMEM. Se pipetea volúmenes iguales de la suspensión celular y de la disolución de azul tripán, transfiriendo 100  $\mu$ L a uno de los compartimentos de una cámara Neubauer. Mediante microscopio invertido se realiza el recuento de células totales (vivas y muertas), así como células teñidas (muertas). Los resultados se expresan como porcentaje de células viables respecto al control.

La funcionalidad de las mitocondrias se evalúa con el test MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil bromo de tetrazolio) que proporciona una medida parcial del metabolismo celular. La reducción de MTT a formazán insoluble en las células viables está catalizada por deshidrogenasas mitocondriales acopladas al proceso de fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria (Mosmann, 1983).

Para el ensayo MTT se trabaja del mismo modo que en el ensayo con azul tripán pero, tras la incubación (2 y 24 h) con los GG, se adiciona 1 mL MTT (0,5 mg/mL en PBS) por pocillo y se incuba durante 2 h a 37°C (95% humedad, 5% CO<sub>2</sub>). Se elimina el sobrenadante y la monocapa celular se lava con PBS. Se adicionan 2 mL de una disolución de isopropanol ácido-tritón 10% (v/v), y se agita durante 5 minutos para disolver el formazán insoluble. Se mide la absorbancia a 570 nm frente a aire y el valor obtenido se corrige con la sustracción de fondo a 690nm. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia con respecto al control.

## 5. Tratamiento estadístico

A lo largo del presente trabajo se utilizan diferentes test de inferencia estadística para la evaluación de los datos obtenidos. En particular se aplican:

- Test de datos apareados para evaluar diferencias entre los métodos de determinación de Sia utilizados.

- Análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores y test de medias LSD para evaluar diferencias entre muestras

Para la realización de todos los estudios se utiliza el *software* Statgraphics Plus v. 5.1 (Rockville, MD, USA). En todos los casos el nivel de significación se ajusta a un nivel de probabilidad del 95%.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **1. Optimización de la determinación de ácido siálico**

### **1.1 Ensayos preliminares con disoluciones patrón**

#### **- Linealidad**

Se preparan 5 curvas de regresión, en un mismo día (intra-día) y en días distintos (inter-día), en el intervalo 6-150  $\mu\text{g}$  de Neu5Ac para el método EAM y 12,5-250 ng de Neu5Ac y 1- 5 ng de Neu5Gc para el método HPLC. Como se observa en el cuadro nº 16, ambos métodos presentan una buena linealidad con coeficientes de variación (CV) del 2 y 8% para los métodos espectrofotométrico y de HPLC, respectivamente.

En la bibliografía no se encuentran datos relativos a la curva de regresión para el método de EAM, si bien Svennerholm (1957) al desarrollar el método para fluidos biológicos utiliza un intervalo de linealidad de 9 a 35  $\mu\text{g}$  de Neu5Ac. Martín *et al.* (2007) indican un intervalo de linealidad entre 25 y 250 ng para la determinación del Neu5Ac por HPLC, mientras que la determinación de Neu5Gc no ha sido validada.

#### **- Precisión**

Se evalúa la precisión intra e inter-día a partir del análisis de patrones de Neu5Ac de 98  $\mu\text{g}$  y 98 ng por los métodos de EAM y HPLC, respectivamente. En el caso del Neu5Gc se ensaya un patrón de 2 ng por HPLC. La precisión intra e inter-día se calcula a partir de las determinaciones por quintuplicado de cada uno de los patrones, en un mismo día, o en tres días consecutivos, respectivamente, y se expresa como CV.

El método espectrofotométrico presenta una precisión intra en inter-día menor al método cromatográfico, siendo en ambos casos inferior a 3,2 y 9,8% respectivamente (ver cuadro n° 17).

**Cuadro n° 16.** Linealidad de los métodos espectrofotométrico y HPLC.

	EAM		HPLC			
	Siálico total		Neu5Ac		Neu5Gc	
<b>Intra-día</b> (n=5)	y=0,0048x - 0,0067 (R <sup>2</sup> =0,9996)		y=15870x - 40419 (R <sup>2</sup> =0,9999)		y=10507x - 2354 (R <sup>2</sup> =0,9999)	
<b>CV (%)</b>	1,0		4,6		3,7	
<b>Inter-día</b> (n=5)	y=0,0051x - 0,0073 (R <sup>2</sup> =0,9997)		y=16262x + 1291 (R <sup>2</sup> =0,9999)		y=10596x - 3744 (R <sup>2</sup> =0,9999)	
<b>CV (%)</b>	1,6		7,9		6,1	

CV (%), coeficiente de variación de las pendientes; n, número de réplicas

**Cuadro n° 17.** Precisión, con disoluciones patrón, de los métodos espectrofotométrico y HPLC.

	Analito	Intra-día <sup>a</sup> (n=5)	Inter-día <sup>a</sup> (n=3)
<b>EAM</b>	Siálico total	1,1	1,6
<b>HPLC</b>	Neu5Ac	3,2	9,8
	Neu5Gc	2,9	4,3

<sup>a</sup>Parámetros de precisión expresados como porcentaje de coeficiente de variación

## **1.2 Ensayos preliminares con muestras**

En el método de HPLC, en estos ensayos preliminares, sólo se determina el Neu5Ac, que es el mayoritario y el único validado previamente en la bibliografía (Martín *et al.*, 2007). En todos los ensayos se utiliza la muestra PL de inicio Ab1

### **1.2.1 Selección de la resina de intercambio aniónico**

En primer lugar se selecciona y optimiza el empleo de una resina de intercambio aniónico para la purificación de las muestras hidrolizadas, ya que la Dowex 2x8 utilizada en los trabajos previamente publicados está descatalogada.

Se estudian dos resinas con características similares a la Dowex 2x8: Dowex Marathon A2, que tiene los mismos grupos de intercambio que la Dowex 2x8 (amina terciaria) pero un tamaño de partícula superior; y Dowex 1x8, que tiene una amina cuaternaria como grupo de intercambio, y un tamaño de partícula igual a la Dowex 2x8. Para los ensayos se toman 2 mL de cada una de las resinas, volumen similar al indicado para la Dowex 2x8.

#### **- Precisión**

Se determina el Sia en el PL por los métodos EAM y de HPLC descritos en el apartado 2 de la parte experimental, utilizando ambas resinas. Se evalúa la precisión del método (intra e inter-día).

Los resultados de precisión expresados como media  $\pm$  desviación estándar se muestran en los cuadros nº 18 y 19.

El contenido de Sia del PL Ab1, obtenido con la resina Marathon A2, es menor al intervalo de valores (100 – 250 mg/L) indicado en la bibliografía (Neeser *et al.*, 1991; Sánchez-Díaz *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2007). Al realizar la elución con un volumen doble de eluyente (40 mL) se comprueba que la causa de estos bajos contenidos de Sia no es una elución incompleta del mismo (ver cuadro n° 18).

**Cuadro n° 18.** Purificación de ácido siálico mediante resina Marathon A2. Ensayos de precisión.

	Intra-día		Inter-día		
	Volumen eluyente (mL)	Siálico total (mg/L) <sup>a</sup>	CV (%)	Siálico total (mg/L) <sup>a</sup>	CV (%)
<b>EAM</b>	<b>20</b>	48,0 ± 7,3	15,1	42,5 ± 6,9	16,5
	<b>40</b>	43,7 ± 3,7	8,5	46,4 ± 6,2	13,4
<b>HPLC</b>		40,4 ± 5,6	13,9	44,7 ± 6,4	14,4

<sup>a</sup> Muestra reconstituida al 13% (p/v).

En cuanto a la resina Dowex 1x8, los contenidos de Sia obtenidos tienen una variabilidad menor al 7%, pero diferentes según el método de determinación que se aplique: 81 ± 1 mg/L por EAM vs. 144 ± 4 mg/L por HPLC (ver cuadro n° 19). Si bien los contenidos obtenidos por HPLC se encuentran en el intervalo de 100 – 250 mg/L indicado anteriormente.

**Cuadro n° 19.** Purificación de ácido siálico mediante resina Dowex 1x8. Ensayos de precisión.

	<b>Intra-día</b>		<b>Inter-día</b>	
	<b>Siálico total (mg/L)<sup>a</sup></b>	<b>CV (%)</b>	<b>Siálico total (mg/L)<sup>a</sup></b>	<b>CV (%)</b>
<b>EAM</b>	83,1 ± 4,2	5,0	80,3 ± 5,3	6,6
<b>HPLC</b>	145,7 ± 3,2	2,2	143,8 ± 5,6	3,9

<sup>a</sup> Muestra reconstituida al 13% (p/v).

- Exactitud

Se evalúa la exactitud mediante ensayos de recuperación. Para ello se toman seis alícuotas del PL, para cada método de determinación y se hidrolizan (ver apartado 2.1 de la parte experimental). A tres de ellas, se les adiciona una cantidad de Sia conocida. Todas las alícuotas se purifican y determinan de acuerdo al procedimiento indicado en el apartado 2 de la metodología. Las recuperaciones de Sia obtenidas se muestran en el cuadro n° 20.

Las recuperaciones obtenidas no son satisfactorias, ya que con la Marathon A2 las recuperaciones son inferiores al 50%, mientras que con la Dowex 1x8 son superiores al 120%.

**Cuadro n° 20.** Purificación de ácido siálico mediante resinas Marathon A2 y Dowex 1x8. Ensayos de recuperación.

	EAM		HPLC	
	Marathon A2	Dowex 1x8	Marathon A2	Dowex 1x8
<b>Presente (n=3)<sup>a</sup></b>	39,9 ± 6,0	89,2 ± 4,9	37,6 ± 5,2	141,7 ± 4,3
<b>Añadido <sup>a</sup></b>	25,0	80,0	40,0	150,0
<b>Hallado (n=3) <sup>a</sup></b>	45,9 ± 5,9	186,1 ± 9,6	52,6 ± 6,1	357,9 ± 7,9
<b>Recuperación (%)</b>	52,3 ± 4,2	121,1 ± 10,7	36,6 ± 4,3	144,1 ± 8,3

<sup>a</sup> mg de ácido siálico total/L muestra reconstituida al 13% (p/v).

Dada la variabilidad obtenida en el contenido de Sia en los ensayos realizados con ambas resinas, se utiliza la resina Dowex 2x8 (descatalogada), amablemente facilitada por la Dra. Martín (laboratorios Abbott). Debido a la poca cantidad de resina disponible, se determina el Sia por triplicado en el PL sólo por HPLC. Se obtiene un contenido de Sia de  $147,8 \pm 12,9$  mg/L (CV=8,7%), similar al obtenido con la resina Dowex 1x8 ( $141,7 \pm 4,3$  mg/L, ver cuadro n° 20).

A la vista de los resultados obtenidos se selecciona la Dowex 1x8 para continuar con la optimización del método.

### 1.2.2 Estudio de compuestos interferentes

Para continuar la evaluación de la resina Dowex 1x8, se realiza un análisis de Sia por espectrometría de masas, para comprobar que la mayor concentración de Sia obtenida por HPLC, frente a EAM, no es debida a interferentes que eluyen al mismo tiempo de retención que el analito. Además se evalúan las posibles interferencias de la matriz que puedan

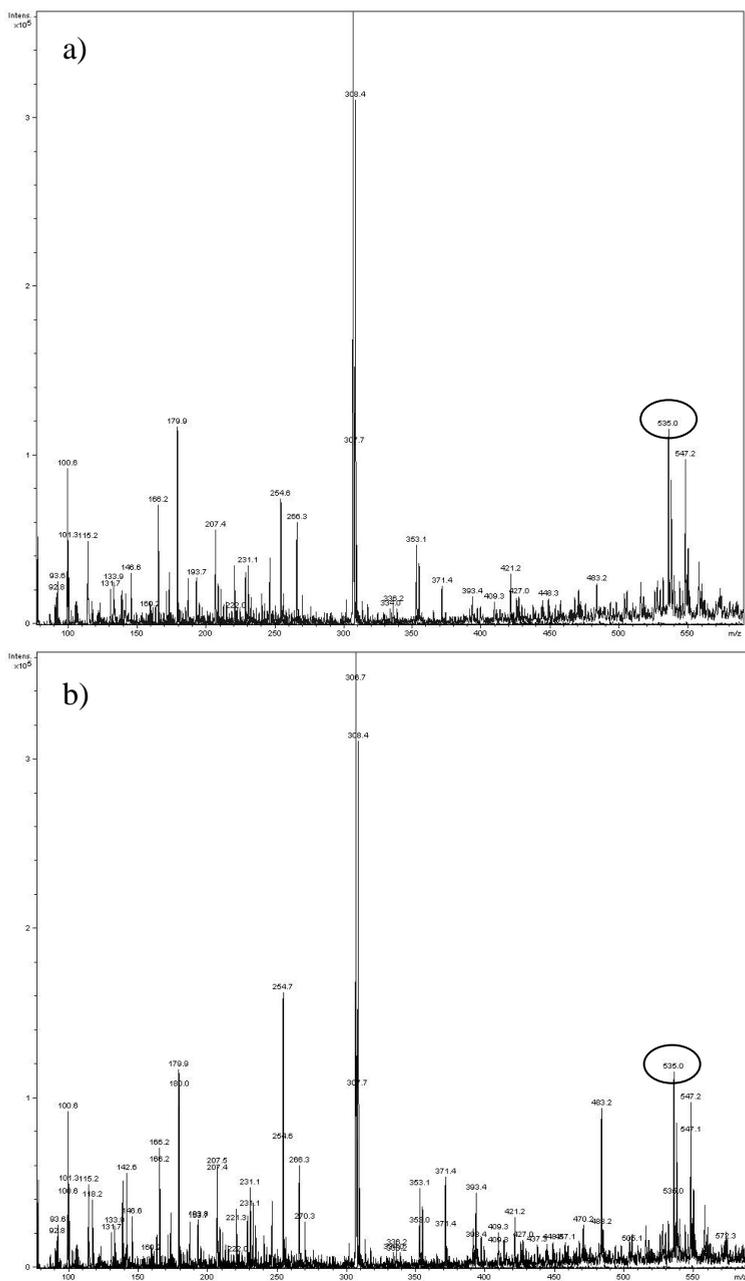
afectar a la señal y justificar los contenidos de Sia menores encontrados con el método espectrofotométrico.

- Análisis por espectrometría de masas

El PL Ab1, previamente hidrolizado, purificado y derivatizado (ver apartados 2.1, 2.2 y 2.4 de la metodología), se inyecta por triplicado en el cromatógrafo en las condiciones descritas en el apartado 2.4 y se recogen las fracciones al tiempo que eluye el Neu5Ac ( $10 \pm 1$  minuto). Estas fracciones y un patrón de Neu5Ac (100 ng) derivatizado se inyectan en el espectrómetro de masas ESI MS/MS. Se aplican las condiciones descritas por Kleint *et al.* (1997): modo positivo; capilar -4300 V; salida del capilar 120 V; plate offset, -500 V; skimmer, 40 V; gas N<sub>2</sub>, 5 L/min; temperatura, 300 °C; presión del nebulizador 10 psi; intervalo m/z de escaneo 50-1000.

En la figura nº 15 se muestra el espectro de masas obtenido para el patrón (a) y la muestra (b).

En los espectros obtenidos se observa que tanto el patrón como la muestra presentan los mismos picos, siendo característico el correspondiente a Neu5Ac-DMB (535 m/z).

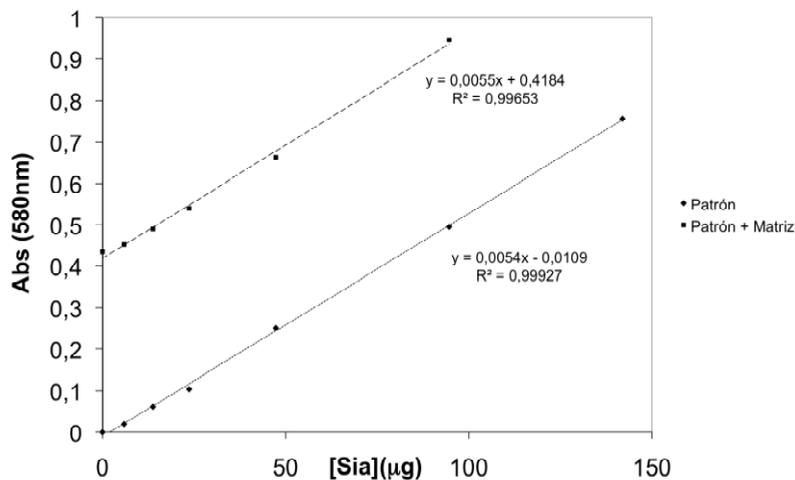


**Figura n° 15.** (a) Espectro de masas del patrón Neu5Ac de 100 ng, (b) espectro de masas del PL Ab1.

- Interferencias de la matriz

Se evalúan las posibles interferencias de matriz en el método EAM por el método de las adiciones. Para ello se preparan dos series de disoluciones acuosas con patrón de Neu5Ac en el intervalo 6-150  $\mu\text{g}$ . A una de las series se le adiciona el PL Ab1 hidrolizado y purificado, en una proporción 1:1.

Los resultados se muestran en la figura n° 16. Se comparan las pendientes con un test de datos apareados y se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), con lo que se concluye que la matriz no interfiere en la determinación.



**Figura n° 16.** Determinación de ácido siálico por espectrofotometría. Ensayo de interferencias de matriz.

### 1.2.3 Optimización del tamaño de muestra

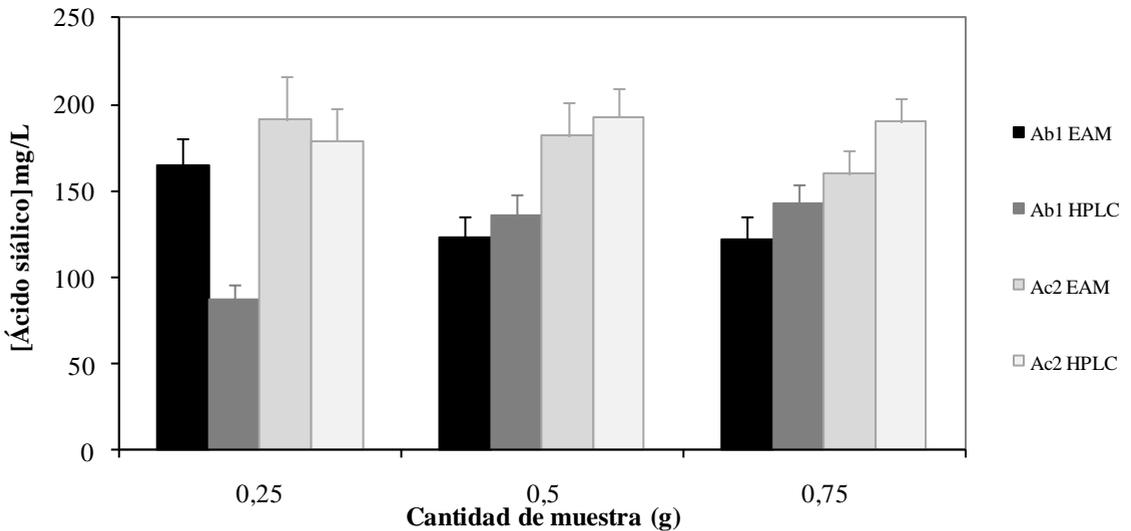
Dado que no se han encontrado interferencias que puedan explicar la diferencia de contenidos obtenida por ambos métodos (83,1 vs. 145,7 mg/L EAM/HPLC), las diferencias podrían deberse a la distinta cantidad de muestra que se utiliza. Por ello, se propone un método común de preparación de la muestra (hidrólisis y purificación). Además, se incluye un paso de centrifugación (200xg, 5 minutos, 4°C) previo a la purificación, para eliminar los residuos de la hidrólisis, que podrían obstaculizar el paso a través de la resina, o provocar adsorción del Sia en cabeza de columna.

Se determina la cantidad de Sia de una muestra de inicio (Ab1) y otra de continuación (Ac2) por ambos métodos partiendo de una purificación común, es decir, se toma una cantidad de muestra determinada, se disuelve en 0,5 mL de agua destilada, se hidroliza con 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M y se purifica con la resina Dowex 1x8 (2mL). Una alícuota de 400 µL se destina a la determinación por HPLC (ver apartado 2.4 de la parte experimental) y el resto se destina a la determinación por EAM (ver apartado 2.3 de la parte experimental).

En primer lugar se realiza un ensayo en el que se utilizan 0,25, 0,5, y 0,75 g de las muestras Ab1 y Ac2, para la determinación por ambos métodos. En la figura nº 17 se pueden ver los resultados obtenidos.

La muestra de continuación, Ac2, no presenta grandes diferencias atendiendo al método aplicado y tamaño de muestra considerado. Para la muestra Ab1, los resultados son similares para ambos métodos tomando 0,5 y 0,75 g de muestra. Sin embargo con 0,25 g de muestra se observan

grandes diferencias de contenidos para la muestra Ab1 según se determine por EAM o HPLC.



**Figura n°17.** Optimización de la cantidad de muestra para la determinación de ácido siálico con la resina Dowex 1x8.

Dado que en esta muestra se deposita en cabeza de columna un residuo, se realiza un nuevo ensayo para ajustar la cantidad, incluyendo un paso de centrifugación. En este nuevo ensayo se trabaja con la cantidad de muestra y dilución descrito en el método original de EAM (Svennerholm, 1957) (0,25 g a 0,50 mL) y lo descrito para HPLC (Martín *et al.*, 2007) (0,75 g a 10 mL), y se determina el Sia. La muestra utilizada es Ab1. Los resultados obtenidos, expresados como media  $\pm$  desviación estándar de una determinación por triplicado, se recogen en el cuadro n° 21.

**Cuadro nº 21.** Optimización de la cantidad de muestra para la determinación de ácido siálico con la resina Dowex 1x8.

	<b>Condiciones EAM (0,25 g/0,5 mL)</b>	<b>Condiciones HPLC (0,75 g/10 mL)</b>
<b>EAM<sup>a</sup></b>	148,1 ± 4,6	140,8 ± 4,7
<b>HPLC<sup>a</sup></b>	116,9 ± 10,1	147,6 ± 4,5

<sup>a</sup> mg de ácido siálico total/L muestra reconstituida al 13% (p/v).

Atendiendo a los resultados, la cantidad y dilución óptima es la que se corresponde con las condiciones de HPLC, ya que los valores no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ). Con estas condiciones se reduce la cantidad de muestra en el ensayo, respecto al método de EAM, 3,5 veces (0,25 y 0,07 g de muestra se cargan en cabeza de columna en EAM y HPLC, respectivamente). También se observa que todos los valores se encuentran dentro del intervalo de 100 – 250 mg/L indicado en la bibliografía (Neeser *et al.*, 1991; Sánchez-Díaz *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2007). Probablemente, la centrifugación corrija los valores anormalmente bajos que se obtenían por EAM.

### **1.3 Validación del método propuesto**

- Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), siguiendo el criterio del Analytical Methods Committee (1987), se determinan con seis blancos. El LD y LC se definen como el triple y decuplo, respectivamente, de la desviación estándar obtenida para los blancos, dividida por la pendiente de la recta de calibrado que se utiliza para cuantificarlos.

Los resultados obtenidos de seis blancos, expresados como ng en el ensayo y mg/L de muestra reconstituida, se recogen en el cuadro n° 22.

**Cuadro n° 22.** Determinación de ácido siálico. Comparación de métodos: límites de detección y cuantificación.

		<b>EAM</b>	<b>HPLC</b>	
		<b>Siálico total</b>	<b>Neu5Ac</b>	<b>Neu5Gc</b>
<b>LD</b>	<b>ng (ensayo)</b>	560	4,22	0,46
	<b>mg/L<sup>a</sup></b>	0,29	0,03	0,003
<b>LC</b>	<b>ng (ensayo)</b>	1860	12,79	1,40
	<b>mg/L<sup>a</sup></b>	0,97	0,08	0,009

<sup>a</sup> Muestra reconstituida al 13% (p/v).

La sensibilidad de ambos métodos es suficiente para la determinación de Sia en PL, si bien el método de HPLC es del orden de 10 veces más sensible.

En el método de HPLC, los LD y LC encontrados son aproximadamente la mitad que los descritos por Martín *et al.* (2007) (LD = 9.9 and LQ = 29.9 ng) para la determinación de Neu5Ac en PL. Recientemente, Spichtig *et al.* (2010) han obtenido un LD de 0,016 y 0,005 ng para la determinación de Neu5Ac y Neu5Gc, respectivamente, por HPLC-fluorescencia, previa derivatización con DMB, en leche y derivados lácteos. Las diferencias con este trabajo pueden deberse a las distintas condiciones utilizadas a nivel cromatográfico (columna, flujo y fase móvil), así como al uso de ácido fórmico en la hidrólisis, en lugar de sulfúrico, que mejora los factores de respuesta del Sia derivatizado.

- Precisión

Las precisiones intra e inter-día se recogen en el cuadro nº 23. Los métodos de determinación por EAM y HPLC presentan una precisión intra-día inferior al 4% y la inter-día inferior al 6%, la precisión en la determinación de Neu5Gc es similar a la del Neu5Ac (por HPLC).

Estos resultados son comparables a la precisión obtenida por el método espectrofotométrico (Svennerholm, 1957) en muestras biológicas, incluyendo la leche de vaca (CV = 1%), y por HPLC en preparados para lactantes (Martín *et al.*, 2007) (Neu5Ac, CV = 4,4%) y leches de crecimiento (Spichtig *et al.*, 2010) (Neu5Ac, CV = 1,9; Neu5Gc, CV = 5,5%).

**Cuadro nº 23.** Determinación de ácido siálico. Comparación de métodos: precisión.

	<b>Analito</b>	<b>Intra-día (n=5)</b>	<b>Inter-día (n=3)</b>
<b>EAM</b>	<b>Siálico total</b>	3,3 <sup>a</sup> (140,8 ± 4,7) <sup>b</sup>	4,9 (142,1 ± 6,9)
	<b>Neu5Ac</b>	3,1 (147,6 ± 4,5)	5,7 (145,4 ± 8,3)
<b>HPLC</b>	<b>Neu5Gc</b>	3,9 (4,1 ± 0,2)	4,3 (4,2 ± 0,1)

<sup>a</sup> Coeficientes de variación en porcentaje.

<sup>b</sup> mg de ácido siálico/L muestra reconstituida al 13% (p/v).

- Exactitud

Se evalúa la exactitud mediante ensayos de recuperación con la muestra Ab1. En el caso del HPLC se ensaya también con una PL a base de soja, que no presenta Sia en su composición. Los resultados se recogen en el cuadro n° 24.

**Cuadro n° 24.** Determinación de ácido siálico. Comparación de métodos: ensayos de recuperación.

	EAM	HPLC			
		PL		Soja	
	Siálico total	Neu5Ac	Neu5Gc	Neu5Ac	Neu5Gc
<b>Presente (n=3)<sup>a</sup></b>	148,7 ± 5,9	147,2 ± 3,9	3,2 ± 0,1	n.d	n.d.
<b>Añadido<sup>a</sup></b>	116,5	120,3	4,7	120,3	4,7
<b>Hallado (n=3)<sup>a</sup></b>	270,2 ± 4,7	260,1 ± 7,4	8,3 ± 0,2	118,7 ± 4,9	5,2 ± 0,1
<b>Recuperación (%)</b>	104,3 ± 3,3	94,1 ± 4,9	108,5 ± 3,9	101,9 ± 5,8	109,1 ± 9,0

<sup>a</sup> mg de ácido siálico/L muestra reconstituida al 13% (p/v).  
n.d., no detectado.

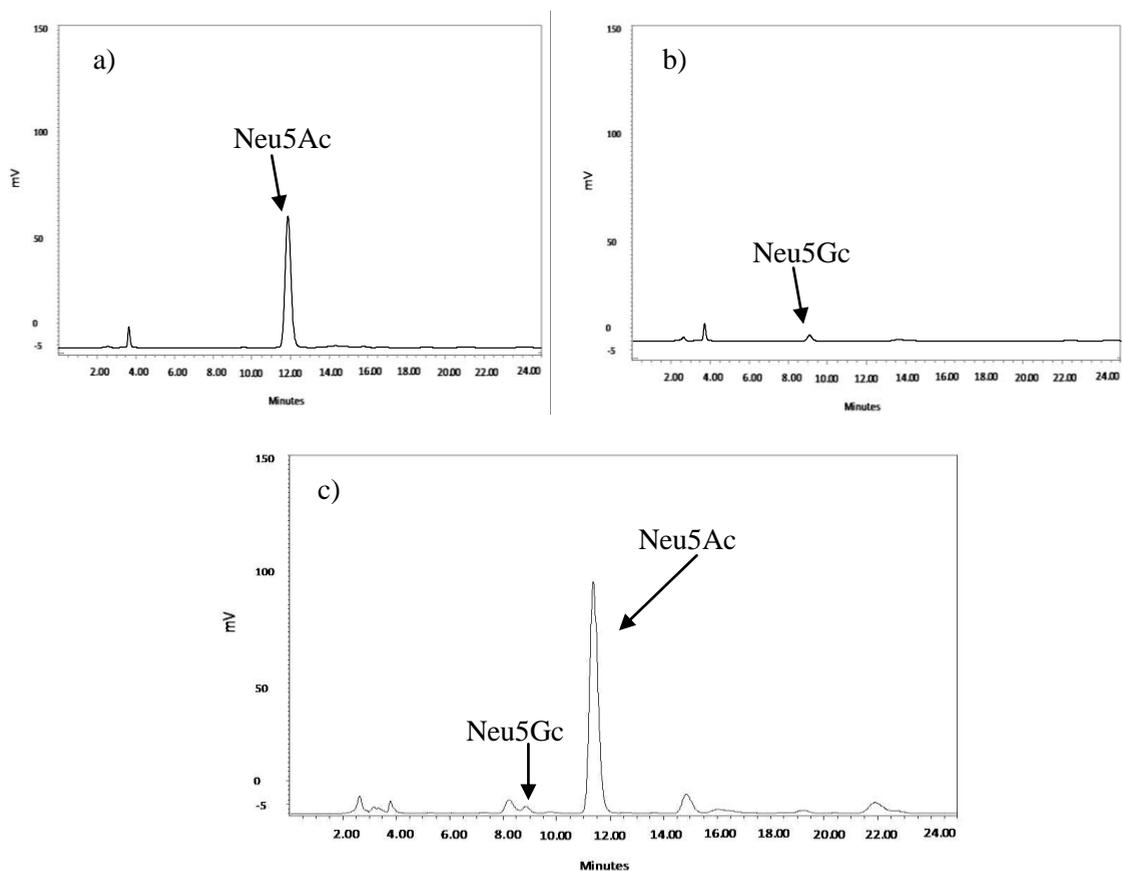
Las recuperaciones obtenidas por Svennerholm (1958) en sistemas modelo, por EAM, se encuentran comprendidas entre el 89 y 95%. Martin *et al.* (2007), obtienen recuperaciones entre el 97 y el 98% para el mismo método de HPLC, en PL. Nuestros resultados son similares a los descritos para Spichtig *et al.* (2010) en leche de crecimiento (Neu5Ac: 96,5 a 101,0%; Neu5Gc: 101,0 a 107,0%).

A la vista de los resultados obtenidos, puede concluirse que ambos métodos (EAM y HPLC) son útiles para su aplicación en la determinación de Sia en preparados lácteos destinados a la alimentación infantil.

## 2. Determinación de ácido siálico

Se determina el contenido de Sia en las muestras descritas en el apartado 1 de la parte experimental, utilizando los métodos de EAM y HPLC.

En la figura nº 18 se muestran los cromatogramas de la muestra Ab1 y de los patrones de Neu5Ac (150 ng) y Neu5Gc (5 ng).



**Figura nº 18.** Cromatogramas de: a) Patrón Neu5Ac (150 ng), b) Patrón Neu5Gc (5 ng) y c) PL Ab1.

## 2.1 Sueros lácteos

Los contenidos de Sia presentes en los sueros objeto de estudio se recogen en el cuadro nº 25.

**Cuadro nº 25.** Sueros lácteos. Contenidos de ácido siálico (mg/100g).

	EAM		HPLC	
	Siálico total	Neu5Ac	Neu5Gc	Neu5Ac / Neu5Gc
<b>SA</b>	1684,3 ± 87,2	1621,1 ± 54,3	2,8 ± 0,1	578,9 ± 54,2
<b>SB</b>	2421,9 ± 91,3	2388,6 ± 76,2	20,2 ± 0,5	118,2 ± 76,2

SA, suero lácteo a base de  $\alpha$ -lactoalbúmina; SB, suero lácteo a base de MFGM.

Al realizar un test de datos apareados con un nivel de confianza del 95% se comprueba que no existen diferencias entre el contenido de Sia total determinado por EAM y HPLC (Neu5Ac + Neu5Gc) ( $p = 0,1913$ ).

La muestra SB contiene 1,5 veces más de Neu5Ac que la SA; en cuanto al Neu5Gc la diferencia es superior (diez veces más en SB que en SA). En la bibliografía no hay datos sobre los contenidos de Sia presentes en estos sueros. Si bien, en el etiquetado de SB se indica que el contenido de Sia total es del 2%, valor cercano al obtenido (2,4%). Este suero está elaborado a partir de MFGM, que según Sánchez-Juanes *et al.* (2009) contiene  $892,2 \pm 189,3$   $\mu\text{g}$  de Sia total/100g. En el caso de SA no se detalla contenido alguno en el etiquetado, y está elaborado a partir de  $\alpha$ -lactoalbúmina, que contiene 1800 mg Sia total/100g (Hopper y McKeinze, 1973).

Neeser *et al.* (1991) estudian dos ingredientes séricos, un suero desmineralizado y un concentrado proteico, obteniendo un contenido de 1396,6 y 1986,9 mg/100g respectivamente. Estos valores de Sia en concentrados proteicos son similares a los obtenidos en el presente trabajo. Las diferencias pequeñas pueden atribuirse a la diferente composición de los concentrados proteicos.

Por otra parte, Spichtig *et al.* (2010) determinan el contenido de Neu5Ac y Neu5Gc en un concentrado proteico, obteniendo 921,0 y 17,6 mg/100g. En este caso las diferencias con las muestras analizadas en el presente estudio son más acusadas para el Neu5Ac, si bien el contenido de Neu5Gc es del mismo orden. Como puede observarse, los contenidos de Sia en los concentrados proteicos utilizados en PL pueden ser muy variables.

## **2.2 Preparados para lactantes**

Se analizan, por triplicado, 4 PL procedentes de un mismo fabricante, mediante los métodos de EAM y HPLC. Los contenidos obtenidos se recogen en el cuadro nº 26.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de determinación utilizados ( $p = 0,8779$ ).

Los contenidos de Sia en los PL analizados se corresponden con los presentes en leche de vaca (ver cuadro nº 6), materia prima utilizada en su elaboración.

Al aplicar un ANOVA a los contenidos de Sia obtenidos, se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los PL ( $p = 0,002$ ). Tras un análisis de medias (LSD) se obtiene que la muestra Ac1 difiere del resto, siendo la que mayor contenido de Neu5Ac o Sia total presenta. Esto puede ser debido a que contiene en su formulación el suero lácteo elaborado a partir de MFGM (SB) (2,4% de Sia). También puede justificarse este hecho por la relación caseína/suero que presenta este PL frente al resto (40/60 vs. 50/50), sugiriendo que el suero es mejor fuente de Sia que la caseína. Previamente otros autores han observado el mismo hecho (Carlson, 1985; Neeser *et al.*, 1991; Sánchez-Díaz *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001). Aunque no se dispone de información acerca de la cantidad de suero adicionada, sí se conoce que el preparado Ad1 tiene la misma formulación que el Ac1, pero con un suero lácteo no rico en Sia; esto hace suponer que la presencia del suero SB en la composición de los PL aumenta la cantidad de Sia en un 19,8%.

La muestra Ab1, formulada con el suero lácteo a partir de  $\alpha$ -lactoalbúmina (SA) no presenta un mayor contenido de Sia que las elaboradas con suero desmineralizado.

Los contenidos de Neu5Ac en las muestras no enriquecidas (Aa1, Ab1 y Ad1), se encuentran en el intervalo 146,2 – 157,4 mg/L. Estos contenidos son superiores a los indicados por Wang *et al.* (2001) (65 – 114 mg Neu5Ac/L), similares a los descritos por Martín *et al.* (2007) (115 – 157 mg Neu5Ac/L), e inferiores a los obtenidos por Sánchez-Díaz *et al.* (1997) (233 – 266 mg Neu5Ac/L). El intervalo para preparados infantiles y leches de crecimiento analizadas por Spichtig *et al.* (2010) es de 119,6 – 265,2 mg

Neu5Ac/L; fuera de este intervalo se encuentra una muestra elaborada a partir de calostro bovino, que presenta un contenido de 325,0 mg Neu5Ac/L, muestra con contenido superior a la Ac1, elaborada a partir de MFGM.

En cuanto al Neu5Gc, los contenidos son distintos en cada preparado. Aa1 y Ab1 presentan contenidos superiores a Ac1 y Ad1. Estas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad en el contenido de Neu5Gc de las materias primas, que unido al bajo contenido de este compuesto en la leche, hace que varíe de una muestra a otra significativamente. La muestra enriquecida Ac1, contiene un 56,3% más que la no enriquecida Ad1, este aumento es mayor que en el caso del Neu5Ac. En cuanto a la adición del suero SA a la muestra Ab1, sí que aumenta el contenido de Neu5Gc, a pesar de que contiene poca cantidad, tal vez este aumento se deba a los factores comentados anteriormente.

Los contenidos de Neu5Gc, comprendidos entre 2,1 – 6,7 mg/L, obtenidos en el presente trabajo, son comparables con los obtenidos por Spichtig *et al.* (2010) para preparados infantiles y leche de crecimiento (4,8 a 8,7 mg/L). Como en el caso de Neu5Ac, el preparado elaborado con calostro bovino, presenta un contenido más alto (14,3 mg/L).

**Cuadro n° 26.** Preparados infantiles. Contenidos de ácido siálico.

	HPLC				EAM	
	Neu5Ac		Neu5Gc		Siálico total	
	mg/100g	mg/L*	mg/100g	mg/L*	mg/100g	mg/L*
<b>Aa1</b>	121,1 ± 3,3 <sup>a</sup>	157,4 ± 4,3	4,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,4	125,8 ± 6,2 <sup>a</sup>	163,6 ± 8,0
<b>Ab1**</b>	113,5 ± 3,5 <sup>b</sup>	147,6 ± 4,5	5,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,7 ± 0,1	108,3 ± 3,6 <sup>b</sup>	140,8 ± 4,7
<b>Ac1***</b>	140,2 ± 6,5 <sup>c</sup>	182,2 ± 8,5	2,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	3,3 ± 0,4	144,2 ± 4,9 <sup>c</sup>	187,5 ± 6,4
<b>Ad1</b>	112,5 ± 3,1 <sup>a,b</sup>	146,2 ± 13,1	1,6 ± 0,2 <sup>d</sup>	2,1 ± 0,2	110,4 ± 5,8 <sup>b</sup>	143,6 ± 7,5
<b>Aa2</b>	127,9 ± 2,8 <sup>a</sup>	166,3 ± 5,0	5,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,4	121,0 ± 2,7 <sup>a</sup>	157,4 ± 3,5
<b>Ab2**</b>	118,1 ± 3,1 <sup>a</sup>	165,3 ± 4,4	5,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	8,3 ± 0,1	111,4 ± 3,8 <sup>a</sup>	155,9 ± 4,9
<b>Ac2***</b>	153,6 ± 5,8 <sup>b</sup>	199,7 ± 7,5	3,8 ± 0,2 <sup>c</sup>	4,9 ± 0,3	155,1 ± 8,2 <sup>b</sup>	201,6 ± 10,7

\*Resultados expresados como mg/L de preparado reconstituido atendiendo a las indicaciones del fabricante.

\*\*Muestra añadida de SA (suero lácteo elaborado a base de  $\alpha$ -lactalbúmina).

\*\*\*Muestra añadida de SB (suero lácteo elaborado a base de MFGM).

Distinta letra superíndice, en la misma columna, indica que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 2.3 Preparados de continuación

Se analizan, por triplicado y por ambos métodos, 3 PC del mismo fabricante. Los resultados obtenidos se recogen en el cuadro nº 26.

Al igual que en la determinación de Sia en PL, no se observan diferencias significativas entre los métodos de análisis ( $p = 0,2180$ ).

Se obtienen diferencias estadísticamente significativas en los contenidos de Neu5Ac ( $p = 0,005$ ), Neu5Gc ( $p = 0,0341$ ) y Sia total ( $p = 0,0215$ ) entre las muestras. Ac2 (conteniendo SB) presenta el mayor contenido de Neu5Ac y Sia total, mientras que Ab2 (conteniendo SA) presenta mayores contenidos de Neu5Gc. Este comportamiento y su justificación es similar al indicado para los PL.

Los contenidos de Neu5Ac (165 – 200 mg/L) se encuentran dentro del intervalo descrito por Sánchez-Díaz *et al.* (1997) y Martín *et al.* (2007) quienes obtienen 150 – 240 y 107 – 166 mg Neu5Ac/L, respectivamente. También están incluidos en el intervalo aportado por Spitchig *et al.* (2010) para preparados infantiles y leche de crecimiento indicado anteriormente. Son ligeramente superiores a los descritos por Wang *et al.* (2001) (133 mg Neu5Ac/L). Los únicos contenidos de Neu5Gc en preparados infantiles y leche de crecimiento aportados en la bibliografía (4,8 – 8,7 mg/L) (Spitchig *et al.*, 2010) son similares a los encontrados en el presente trabajo.

Considerando en conjunto las muestras PL y las PC no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ellas en cuanto al contenido de Neu5Ac ( $p = 0,053$ ), siendo la media de  $158,3 \pm 16,7$  y

177,1 ± 19,6 mg/L para los PL y PC, respectivamente. En cuanto al Neu5Gc sí existen diferencias ( $p = 0,006$ ), entre PL y PC ( $4,5 \pm 2,2$  vs.  $6,6 \pm 1,7$  mg/L).

#### **2.4 Preparados especiales para lactantes**

Se analizan, por triplicado y por ambos métodos, 5 preparados especiales (sin lactosa, parcialmente hidrolizado y extensamente hidrolizado), descritos en el apartado 1 de la parte experimental. Los resultados obtenidos se recogen en el cuadro nº 27.

En este caso, tras aplicar un test de datos apareados, se observan diferencias entre los métodos de análisis ( $p = 0,0000$ ). Mediante HPLC se obtienen unos contenidos ligeramente superiores. Las diferencias obtenidas pueden deberse a que los métodos están puestos a punto para preparados con base láctea, y estas muestras están elaboradas a base de hidrolizados, en unos casos, o tratados para eliminar la lactosa, en otros casos.

**Cuadro n° 27.** Preparados especiales. Contenidos de ácido siálico.

	HPLC			EAM		
	Neu5Ac		Neu5Gc	Siálico total		
	mg/100g	mg/L*	mg/100g	mg/L*	mg/100g	mg/L*
<b>Ba3</b>	42,4 ± 3,2 <sup>a</sup>	55,1 ± 4,1	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,1	40,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	51,2 ± 0,9
<b>Ba4</b>	147,6 ± 15,1 <sup>b</sup>	200,8 ± 20,5	1,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,0	129,6 ± 1,5 <sup>b</sup>	176,2 ± 2,1
<b>Ba5</b>	171,1 ± 15,7 <sup>b</sup>	217,3 ± 20,0	3,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	3,8 ± 0,3	143,8 ± 4,3 <sup>b</sup>	182,6 ± 5,5
<b>Ca3,5</b>	57,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	77,3 ± 1,0	2,2 ± 0,1 <sup>d</sup>	3,0 ± 0,1	45,7 ± 1,8 <sup>a</sup>	61,7 ± 2,5
<b>Da5</b>	152,3 ± 15,1 <sup>b</sup>	239,1 ± 23,8	1,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,1	132,1 ± 9,7 <sup>c</sup>	207,4 ± 15,3

\*Resultados expresados como mg/L de preparado reconstituido atendiendo a las indicaciones del fabricante.

Distinta letra superíndice, en la misma columna, indica que existen diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Promediando valores obtenidos con ambos métodos, los contenidos se encuentran en el intervalo comprendido entre 50 y 220 mg de Neu5Ac/L y 1,4 y 3,8 mg de Neu5Gc/L. Los preparados sin lactosa (Ba3 y Ca3,5) tienen unos contenidos de Neu5Ac significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ), al resto de preparados especiales, y a los PL convencionales. Los preparados parcial y extensamente hidrolizados tienen cantidades de Neu5Ac superiores a los PL, y similares al PL Ac1, que es el formulado con el suero SB. Estas diferencias en las concentraciones de Sia podrían ser atribuidas a su formulación (ver cuadro n° 14 de la parte experimental) que incluye concentrados o hidrolizados de seroproteínas de origen lácteo y en algún caso (Ba5) oligosacáridos de origen lácteo. Debe señalarse que, si bien, algunos preparados pueden presentar una misma relación caseína/suero, esto no determina la riqueza en Sia.

## 2.5 Leche humana

El contenido de Sia de la mezcla de LH madura, determinado por triplicado, es de  $299,9 \pm 7,8$  mg de Neu5Ac/L y  $2,1 \pm 0,2$  mg de Neu5Gc (HPLC);  $312,4 \pm 11,2$  (EAM). Los resultados no presentan diferencias debidas al método de análisis ( $p = 0,3141$ )

El contenido de Neu5Ac obtenido es similar al descrito por Neeser *et al.* (1991) (270,0 mg/L) para una LH de ese periodo de lactancia, pero inferior al indicado por Martín-Sosa *et al.* (2004) (525,8 mg/L) en un periodo inferior (1 mes) al estudiado en el presente trabajo. A parte del periodo de lactancia, los diferentes contenidos entre autores pueden deberse a la influencia de factores genéticos, geográficos y dietéticos (Wang, 2009).

Sobre los contenidos de Neu5Gc no se han encontrado datos en la bibliografía.

La concentración de Sia en la LH analizada, es un 50 y un 45% superior a la concentración media de PL y PC, respectivamente. Incluso es superior a los de aquellos preparados enriquecidos con el suero rico en Sia (Ac1 39% y Ac2 33% menores).

### 3. Ingestas de ácido siálico

La estimación de la ingesta de Sia se realiza sólo durante los seis primeros meses de vida, puesto que a partir de esta edad, los preparados dejan de ser el alimento exclusivo (Moreno *et al.*, 2010), incluyéndose en la alimentación del recién nacido otras fuentes de Sia. Por lo tanto sólo se calcula para los PL Aa1, Ab1, Ac1 y Ad1, así como los PL especiales Ba3, Ba4, Ba5, Ca3,5 y Da5.

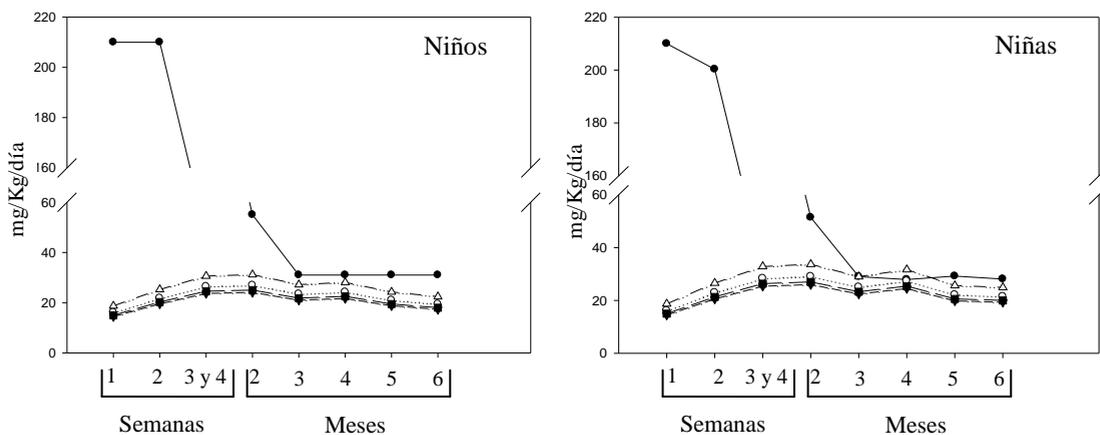
La ingesta diaria de Sia se calcula a partir de:

- El contenido de Sia en los PL y preparados especiales para lactantes, expresado en mg/100g (ver cuadro nº 26 y 27).
- La ingesta diaria de PL (g/día), indicados por el fabricante, en función de los diferentes grupos de edad (ver cuadro nº 28).
- Los pesos en el percentil 50 de niños y niñas, obtenidos de las curvas y tablas de crecimiento de la OMS (2006) (ver cuadro nº 28).

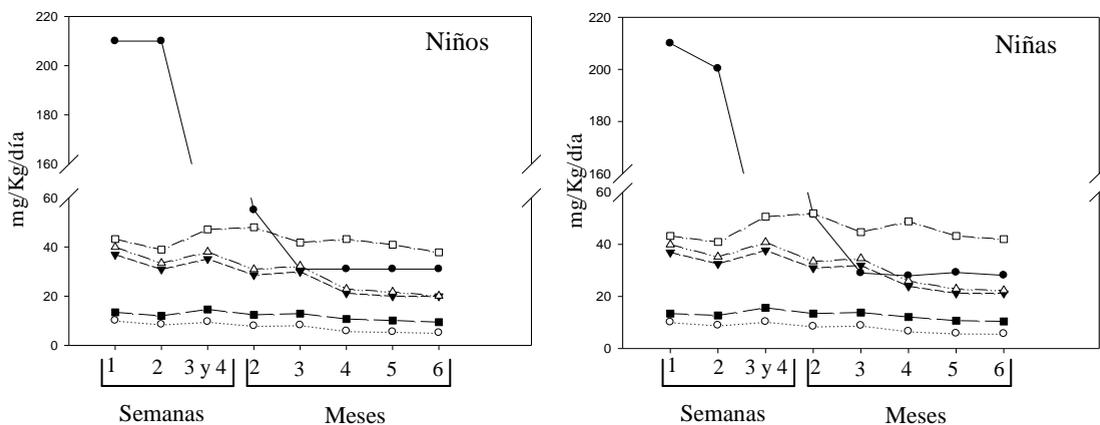
Las ingestas calculadas se muestran en la figura nº 19.

**Cuadro n° 28.** Ingesta diaria de preparados para lactantes y preparados especiales para lactantes indicadas por el fabricante en función de la edad y el peso.

Edad	Peso (Kg)		Preparados (g/día)			
	Niños	Niñas	Aa1, Ab1, Ac1 y Ad1	Ba3, Ba4 y Ba5	Ca3,5	Da5
<b>1ª semana</b>	3,6	3,6	48	86	81	84,6
<b>2ª semana</b>	4	3,8	72	80	81	84,6
<b>3ª y 4ª semana</b>	4,4	4,1	96	100	108	112,8
<b>2 meses</b>	5,4	5	120	100	112,5	141
<b>3 meses</b>	6,2	5,8	120	120	135	141
<b>4 meses</b>	7	6,2	140	96	126	164,5
<b>5 meses</b>	7,4	7	128	96	126	164,5
<b>6 meses</b>	8	7,2	128	96	126	164,5



a) —●— LH calculada a partir de Carlson (1985); .....○..... Aa1; —▼— Ab1; ---△--- Ac1; —■— Ad1.



b) —●— LH calculada a partir de Carlson (1985); .....○..... Ba3; —▼— Ba4; ---△--- Ba5; —■— Ca3y5; —□— Da5.

**Figura nº 19.** Ingestas diarias de ácido siálico a partir de preparados infantiles: a) preparados para lactantes, b) preparados especiales para lactantes.

Las ingestas más altas las aportan los preparados especiales hidrolizados, excepto en el caso de Ca3,5, que contiene una cantidad baja de

Sia, seguidos del preparado Ac1, formulado con el ingrediente rico en Sia SB.

En la bibliografía no se han encontrado recomendaciones sobre la ingesta de Sia. Carlson (1985), en un estudio con 47 mujeres sanas, determina la ingesta de Sia, en su forma Neu5Ac, en lactantes alimentados con LH.

El calostro contiene mayor cantidad de Sia, que la leche madura. Esto, unido al hecho de que el peso del lactante va aumentando con el tiempo, explica el descenso de las ingestas a lo largo de la lactancia.

Según puede observarse en la figura nº 19, las diferencias más acusadas, entre la LH y los PL se dan en las cuatro primeras semanas de vida, cuando precisamente más necesario es el aporte de Sia. A partir del tercer mes las ingestas se igualan, incluso las proporcionadas por Aa1 y Ac1 en niñas superan a las aportadas por la LH en el cuarto mes. En el caso de los preparados especiales, los Ba3, Ca3y5 y Da5 superan a los aportados en por la LH a partir del tercer mes tanto en niños como en niñas.

La ingesta de Sia aportado por la LH (4-7 meses) analizada (40 mg/Kg/día, considerando el quinto mes) es acorde a los valores referenciados para LH madura (Carlson, 1985).

## 4. Gangliósidos

### 4.1 Contenido total

Los contenidos totales de GG de las muestras analizadas se recogen en el cuadro nº 29. Para los PL y PC se analizan dos lotes (1 y 2).

**Cuadro nº 29.** Contenido total de gangliósidos de las muestras analizadas.

Muestra	Lote	mg ASUL/100g	mg ASUL/L*
<b>Sueros lácteos</b>			
SA	-	0,71 ± 0,13	-
SB	-	55,61 ± 2,3	-
<b>PL</b>			
Aa1 <sup>a</sup>	1	0,90 ± 0,01	1,17 ± 0,01
	2	0,96 ± 0,03	1,24 ± 0,04
Ab1 <sup>b</sup>	1	0,63 ± 0,01	0,82 ± 0,01
	2	0,72 ± 0,02	0,93 ± 0,03
Ac1 <sup>c</sup>	1	1,85 ± 0,07	2,41 ± 0,10
	2	1,67 ± 0,05	2,17 ± 0,07
Ad1 <sup>d</sup>	1	0,48 ± 0,05	0,63 ± 0,07
	2	0,51 ± 0,01	0,66 ± 0,01
<b>PC</b>			
Aa2 <sup>a</sup>	1	0,17 ± 0,02	0,22 ± 0,02
	2	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,01
Ab2 <sup>a</sup>	1	0,22 ± 0,02	0,28 ± 0,03
	2	0,20 ± 0,02	0,26 ± 0,02
Ac2 <sup>a</sup>	1	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,01
	2	0,18 ± 0,01	0,24 ± 0,01

**Cuadro n° 29 (continuación).** Contenido total de gangliósidos de las muestras analizadas.

<b>Muestra</b>	<b>Lote</b>	<b>mg ASUL/100g</b>	<b>mg ASUL/L*</b>
<b>Preparados especiales</b>			
<b>Ba3<sup>a</sup></b>	-	0,19 ± 0,05	0,24 ± 0,06
<b>Ba4<sup>a,b</sup></b>	-	0,25 ± 0,10	0,32 ± 0,13
<b>Ba5<sup>c</sup></b>	-	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,02
<b>Ca3,5<sup>d</sup></b>	-	1,18 ± 0,22	1,53 ± 0,29
<b>Da5<sup>b</sup></b>	-	0,31 ± 0,05	0,40 ± 0,07
<b>LH</b>			
-	-	-	2,29 ± 0,06

\*Muestras reconstituidas atendiendo a las recomendaciones del fabricante.

Distinta letra superíndice, en la misma columna, para un mismo tipo de preparado, indica que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

SB, contiene unas 80 veces más ASUL que el SA. Este hecho concuerda con las fuentes a partir de las cuales se han elaborado (MFGM o  $\alpha$ -lactoalbúmina, respectivamente), así como al contenido de grasa presente en cada uno de ellos (SA 2% vs. SB 18,2%). Sánchez-Juanes *et al.* (2009) obtienen un contenido total de GG en MFGM de vaca de 113,2  $\mu\text{g}$  ASUL/100g. El mayor contenido de GG que presenta SB puede deberse a la composición de éste.

No se han encontrado datos en la bibliografía sobre estos sueros, pero Neeser *et al.* (1991) obtienen contenidos de 25,1 y 29,7 mg ASUL/100g de suero desmineralizado y concentrado proteico, respectivamente. Como se ha comentado previamente SA y SB son concentrados proteicos, con lo que se podrían comparar con el segundo ingrediente analizado por Neeser *et al.* (1991). Como en el caso del Sia, SA tiene un contenido menor que el indicado por Neeser *et al.* (1991) y SB superior, siendo las diferencias

mucho mayores que las encontradas en el Sia. Estas diferencias se atribuyen a la distinta composición de los ingredientes de estos sueros.

Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las concentraciones medias de GG totales en PL ( $1,25 \pm 0,68$  mg ASUL/L) y PC ( $0,25 \pm 0,03$  mg ASUL/L). Los contenidos más bajos en los PC respecto de los PL se asemejan al descenso que se produce en la LH durante el periodo de lactación (Takamizawa *et al.*, 1986).

A la vista de estos resultados se aplica un ANOVA para cada tipo de preparado. Los contenidos de GG difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) en todos los PL y están comprendidos entre 0,50 y 1,76 mg ASUL/L. El mayor contenido de ASUL en Ac1 se atribuye a que contiene SB en su composición. El enriquecimiento con el suero a base de MFGM, aumenta un 285% la cantidad de ASUL en Ac1, respecto a la muestra con similar composición pero sin este ingrediente (Ad1).

El contenido de ASUL en los PC no presenta diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (0,18 – 0,21 mg ASUL/L). En este caso la presencia del suero SB en la composición no afecta al contenido de GG. Se desconoce el porcentaje del mismo en la composición de esta muestra, lo que dificulta la interpretación de los resultados.

En general, el contenido de GG en los PL, excepto en el caso de Ac1, y en los PC son similares a los descritos por Sánchez-Díaz *et al.* (1997) (PL: 0,95 – 1,36 mg ASUL/L; PC: 0,27 – 1,17 mg ASUL/L). Todos los contenidos, excepto en Ac1, son inferiores a los descritos en leche de vaca por Neeser *et al.* (1991) (2,0 mg/L), Puente *et al.* (1992) (1,4 mg/L) y

Sánchez-Díaz *et al.* (1997) (1,5 mg/L). Algunos autores han encontrado en preparados infantiles contenidos totales de GG superiores a los de la leche de vaca (6 mg ASUL/L – Laegreid, 1986; 3,8-6,2 mg ASUL/L – Neeser *et al.*, 1991; 4,5-4,9 mg ASUL/L – Pan e Izumi, 2000). Neeser *et al.* (1991) atribuyen estos resultados a la forma en la que se elaboran los preparados. Durante la preparación de los ingredientes pueden romperse los glóbulos grasos, liberando GG que se reparten entre distintas fracciones (grasa, sólidos no solubles y/o suero). La mezcla de éstas para obtener el producto final puede incrementar el contenido total de GG, respecto a la leche original, según la proporción en la que se adicionen cada una de las fracciones.

En cuanto a los preparados especiales, en general, los contenidos totales de GG son inferiores a los de los PL y más semejantes a los de PC.

Puente *et al.* (1996) encuentran una relación entre la concentración de grasa presente en leche de distintas especies y el contenido total de GG. Este hecho no ha sido observado en este trabajo, debido a que la concentración de grasa es muy similar y a que presentan grasa de origen vegetal.

El tratamiento de termización (65°C, 30 segundos) no altera el contenido de GG de la leche (Puente *et al.*, 1996), y los tratamientos térmicos por UHT o pasteurización no modifican el contenido de Sia presente en las fracciones grasa y no grasa de la leche (Neeser *et al.*, 1991). Dado que las muestras analizadas sufren un mismo tratamiento térmico (pasteurización y deshidratación en torre de secado), a excepción de Ac2 que se somete a una pasteurización y un tratamiento térmico alrededor de

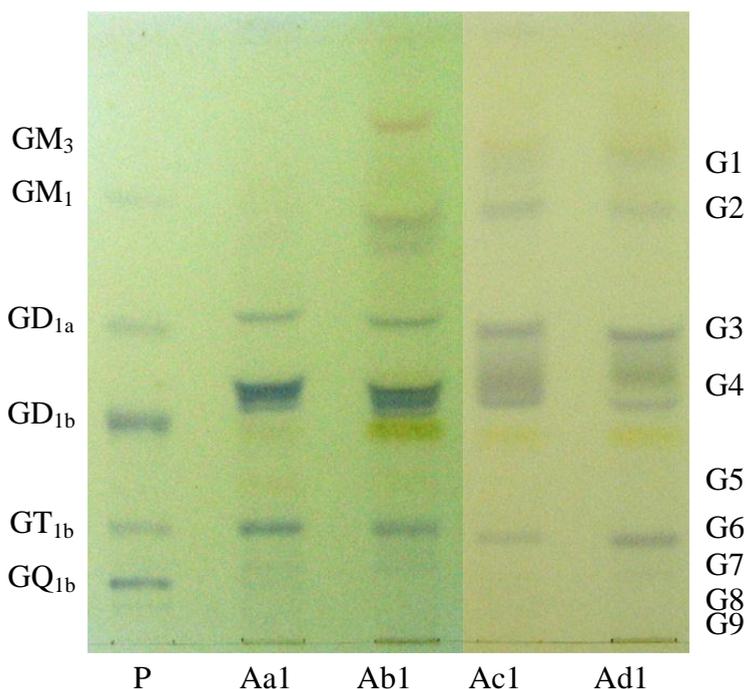
100°C, no se pueden justificar las diferencias en el contenido de GG en base a este factor.

Los contenidos de GG en la LH son muy variables y decrecen a lo largo de la lactancia (ver apartado 3.5 de los antecedentes bibliográficos). En el periodo estudiado (4-7 meses), los contenidos (mg ASUL/L) referenciados en la bibliografía son del orden de 4 (Japón) (Takamizawa *et al.*, 1986), 10,4 (Suiza) (Nesser *et al.*, 1991) y 11 (Noruega) (Laegreid *et al.*, 1986). La leche analizada presenta valores inferiores a los indicados anteriormente, aunque Martín-Sosa *et al.* (2004), en mujeres españolas, obtienen valores de 0,33 mg ASUL/L para leche madura de un mes.

## **4.2 Identificación y porcentajes relativos**

- Preparados para lactantes:

Se identifican los GG presentes en dos lotes de PL (Aa1, Ab1, Ac1 y Ad1) por HPTLC, según se describe en el apartado 3.4 de la parte experimental, utilizando como patrón (P) GG de cerebro bovino adicionados de patrón de GM<sub>3</sub>. En la figura nº 20 se muestra una placa de HPTLC con estos PL.



**Figura n° 20.** Preparados para lactantes. Identificación de gangliósidos por HPTLC.

Se obtienen 9 bandas (G1 a G9, de menor a mayor polaridad) que, por su color azul-violeta se identifican como GG. Por comparación con el patrón y lo descrito en trabajos previos (Sánchez-Díaz *et al.*, 1997) se identifica GM<sub>3</sub> (G1), que aparece como una doble banda que corresponden a distintas formas de este gangliósido, los cuales se diferencian en la composición de su ceramida, lo que da una diferente solubilidad en la fase móvil.

Se identifica GD<sub>3</sub> (G4) (entre GD<sub>1a</sub> y GD<sub>1b</sub> del patrón) que presenta la doble-triple banda característica. En este caso, además de las diferencias en la composición de la ceramida, pueden existir moléculas de GD3 que difieran en su contenido en ácidos siálicos, y que contengan Neu5Ac o

Neu5Gc, o ambos a la vez. Esto ya fue descrito por Martín *et al.* (2001) para la leche de vaca.

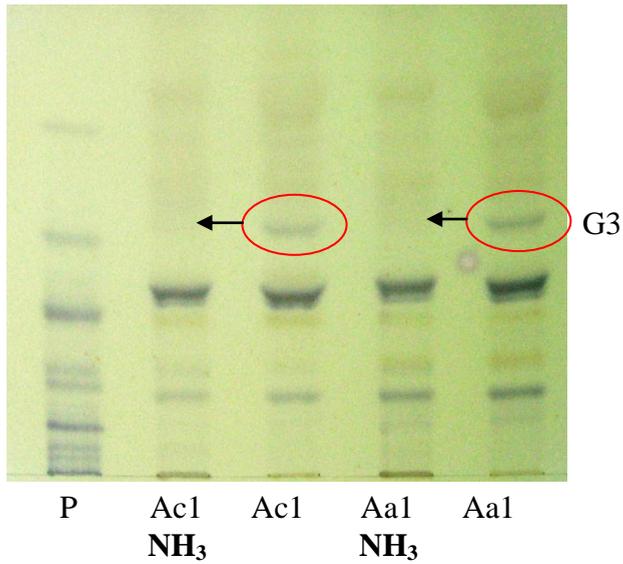
G2 presenta la misma movilidad cromatográfica que el patrón de GM<sub>1</sub>.

G3, según su movilidad, podría ser GD<sub>1a</sub>, GG no identificado con anterioridad en PL; también podría tratarse de *O*-acetil-GD<sub>3</sub> o una lactona de GD<sub>3</sub> (Puente *et al.*, 1992). Para comprobarlo se realiza una hidrólisis alcalina sobre Aa1 y Ac1 (según se describe en el apartado 3.5.1 de la parte experimental) por ser los que tienen mejor definida la banda G3. La ausencia de las bandas correspondientes a G3 tras el tratamiento alcalino confirma que corresponde a la forma *O*-acetilada del GD<sub>3</sub> (ver figura nº 21).

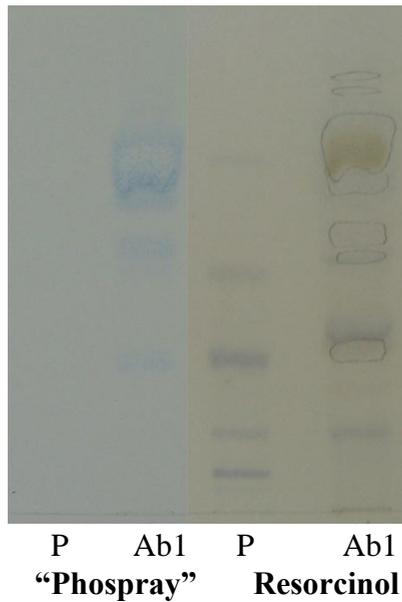
G5 y G6, atendiendo a la bibliografía (Puente *et al.*, 1992), por la posición que ocupan, corresponden a *O*-acetil-GT<sub>3</sub> y GT<sub>3</sub>, respectivamente.

No se ha podido identificar de G7 a G9, si bien éstos son minoritarios y no están presentes en todas las muestras.

En la muestra Ab1 se observa una banda rosada entre G1 y G2 (ver figura nº 20), que podrían ser fosfolípidos. Para confirmarlo se revela una placa con “Phospray”, reactivo específico para fosfolípidos. Tras la desaparición del color azul, con resorcinol, se confirma la presencia de fosfolípidos en esa zona, ya que toman color azul tras el revelado con “Phospray” (ver figura nº 22).

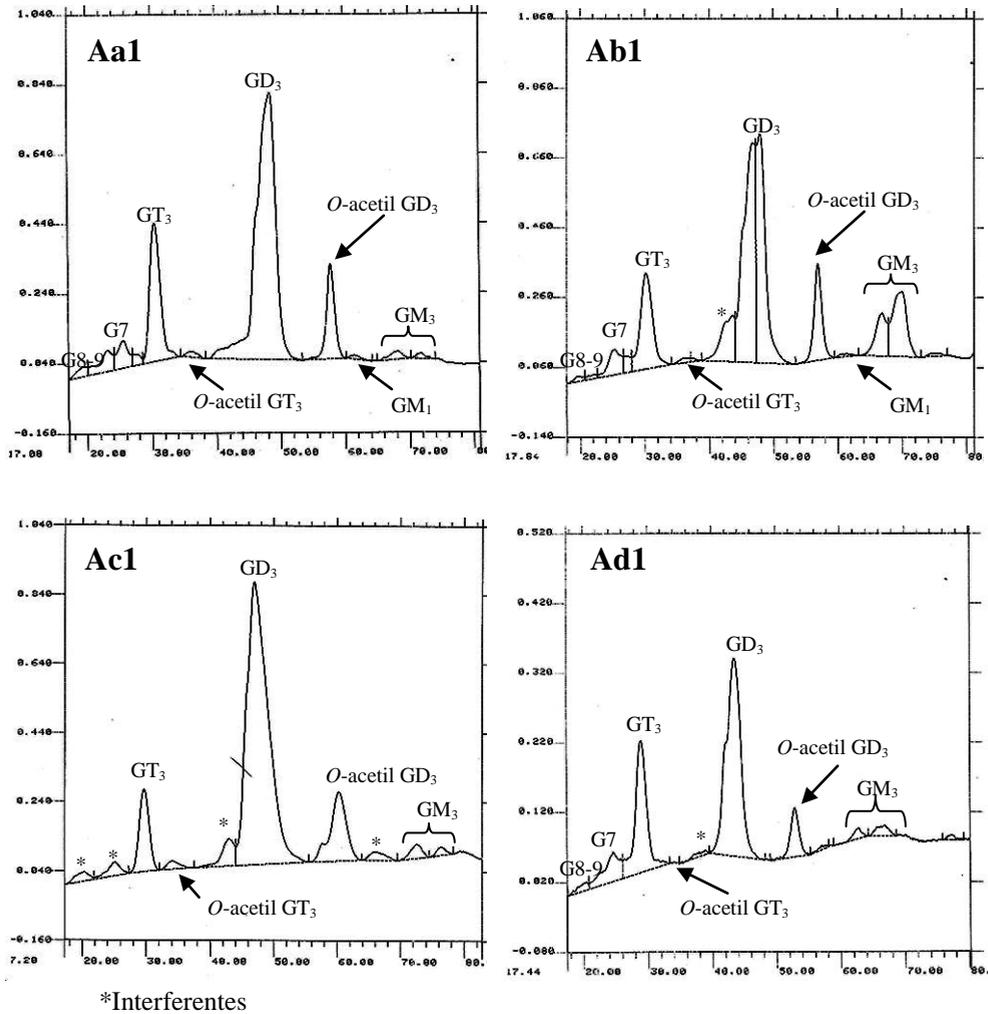


**Figura n° 21.** Preparados para lactantes. Prueba de confirmación de la presencia de *O*-acetil-GD<sub>3</sub>.



**Figura n° 22.** Preparados para lactantes. Confirmación de la presencia de fosfolípidos.

Una vez identificados los GG y los posible interferentes, se calculan los porcentajes relativos de cada gangliósido por densitometría (ver figura n° 23 y cuadro n° 30).



**Figura n° 23.** Preparados para lactantes. Densitogramas.

**Cuadro n° 30.** Preparados para lactantes. Porcentajes relativos de gangliósidos.

	<b>Lote</b>	<b>Aa1</b>	<b>Ab1</b>	<b>Ac1</b>	<b>Ad1</b>
<b>GM<sub>3</sub></b>	1	2,74 ± 1,20	15,00 ± 2,10	8,11 ± 1,50	7,03 ± 0,05
	2	4,63 ± 2,45	10,93 ± 4,61	12,39 ± 1,54	12,42 ± 0,52
<b>GM<sub>1</sub></b>	1	0,49 ± 0,42	0,41 ± 0,08	n.d.	n.d.
	2	0,38 ± 0,35	0,59 ± 0,53	n.d.	n.d.
<b>O-acetil GD<sub>3</sub></b>	1	9,61 ± 0,50	8,19 ± 1,81	10,98 ± 2,96	6,82 ± 0,63
	2	10,67 ± 0,34	12,19 ± 0,20	8,26 ± 0,87	9,92 ± 1,25
<b>GD<sub>3</sub></b>	1	64,11 ± 2,25	57,41 ± 2,82	71,87 ± 3,51	65,72 ± 3,79
	2	65,28 ± 4,63	60,18 ± 7,52	73,59 ± 3,13	53,70 ± 2,29
<b>O-acetil GT<sub>3</sub></b>	1	1,13 ± 0,42	1,04 ± 0,33	0,91 ± 0,03	n.d.
	2	2,94 ± 0,41	2,64 ± 0,83	1,54 ± 0,43	n.d.
<b>GT<sub>3</sub></b>	1	15,91 ± 1,39	13,25 ± 0,84	8,13 ± 0,92	15,73 ± 1,26
	2	11,33 ± 1,12	11,03 ± 2,15	4,23 ± 0,28	19,03 ± 1,12
<b>G7</b>	1	4,04 ± 1,70	4,28 ± 0,77	n.d.	3,37 ± 1,50
	2	3,76 ± 0,67	2,14 ± 0,68	n.d.	4,45 ± 0,52
<b>G8</b>	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	0,73 ± 0,12	0,30 ± 0,43	n.d.	0,05 ± 0,08
<b>G9</b>	1	n.d.	n.d.	n.d.	0,43 ± 0,07
	2	0,29 ± 0,41	n.d.	n.d.	0,42 ± 0,16

n.d. No detectado.

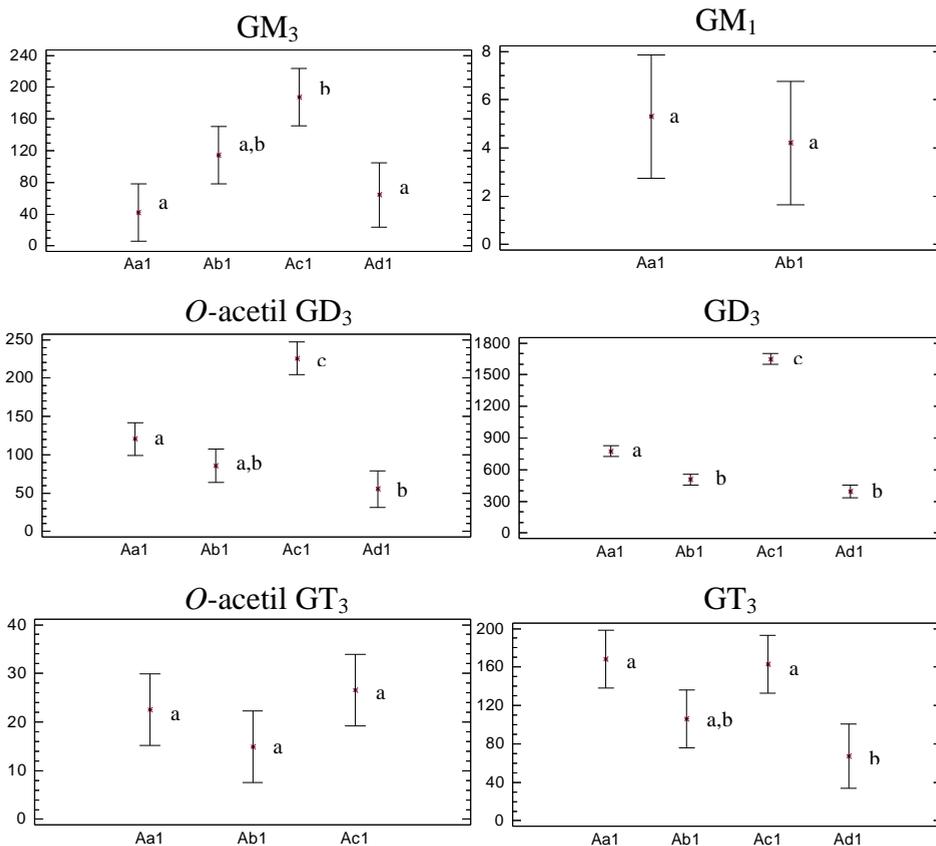
El GG mayoritario en todos los PL es GD<sub>3</sub> (53,70 – 73,59 %), seguido de GT<sub>3</sub> (4,23 – 15,91 %) y GM<sub>3</sub> (2,74 – 15,00 %), perfil acorde al correspondiente a la leche de vaca (GD<sub>3</sub> 60-70%, GT<sub>3</sub> 10% y GM<sub>3</sub> 7-10%; serie “hemato”, Puente *et al.*, 1992). Estos valores están en consonancia con los descritos para este tipo de preparados por Sánchez-Díaz *et al.* (1997),

GD<sub>3</sub> (64,9 – 77,0 %), GT<sub>3</sub> (3,4 – 17,1 %), GM<sub>3</sub> (2,3 – 10,9 %) y con los de Laegreid *et al.* (1986) GD<sub>3</sub> (80%) y GM<sub>3</sub> (3%). La presencia de GG *O*-acetilados encontrados en las muestra analizadas (*O*-acetil GD<sub>3</sub> y GT<sub>3</sub>) se debe a que en su composición hay compuestos de “membrana”, como grasa láctea, concentrados proteicos, etc (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009).

Dado que existen diferencias en los contenidos totales de GG en los PL, se calcula el contenido de cada uno de los GG individuales a partir del porcentaje y el contenido total. Se aplica un ANOVA, con el fin de evaluar si el contenido de cada uno de los GG es distinto en función de la muestra (ver figura n° 24).

Destaca la muestra Ac1 por presentar contenidos más altos de GD<sub>3</sub>, GM<sub>3</sub> y *O*-acetil GD<sub>3</sub>, respecto al resto de las muestras, justificado por la presencia de SB en su composición.

La adición de SA a la muestra Ab1 no parece influir en el contenido individual de GG.

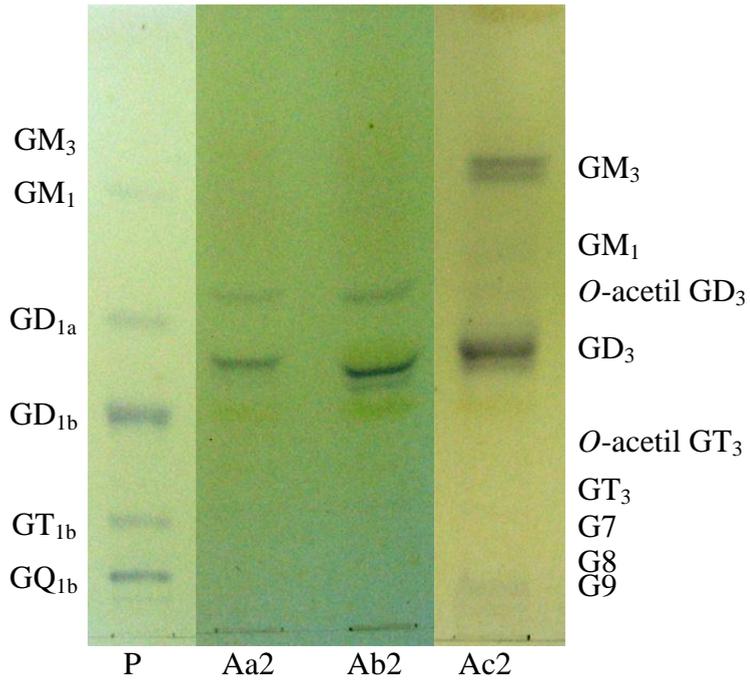


Distinta letra para cada gangliósido, indica que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras.

**Figura n° 24.** Contenido de gangliósidos individuales, expresado como intervalo de confianza de la media ( $\mu\text{g ASUL/L}$ ), en los preparados para lactantes (test LSD).

- Preparados de continuación:

En la figura n° 25 se muestra la placa de HPTLC obtenida con estas muestras.



**Figura n° 25.** Preparados de continuación. Identificación de gangliósidos por HPTLC.

En la figura n° 26 y el cuadro n° 31 se muestran los densitogramas y el porcentaje relativo de gangliósidos, respectivamente.

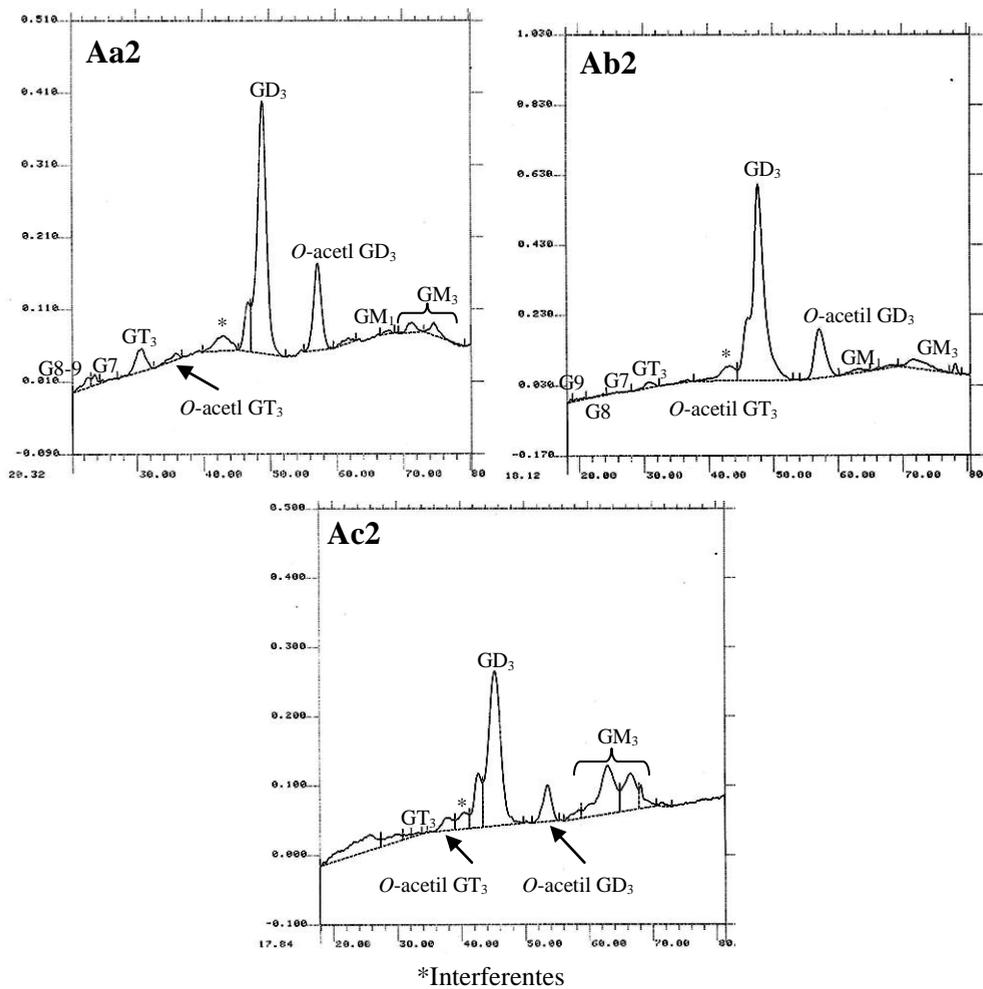


Figura n° 26. Preparados de continuación. Densitogramas.

**Cuadro n° 31.** Preparados de continuación. Porcentajes relativos de gangliósidos.

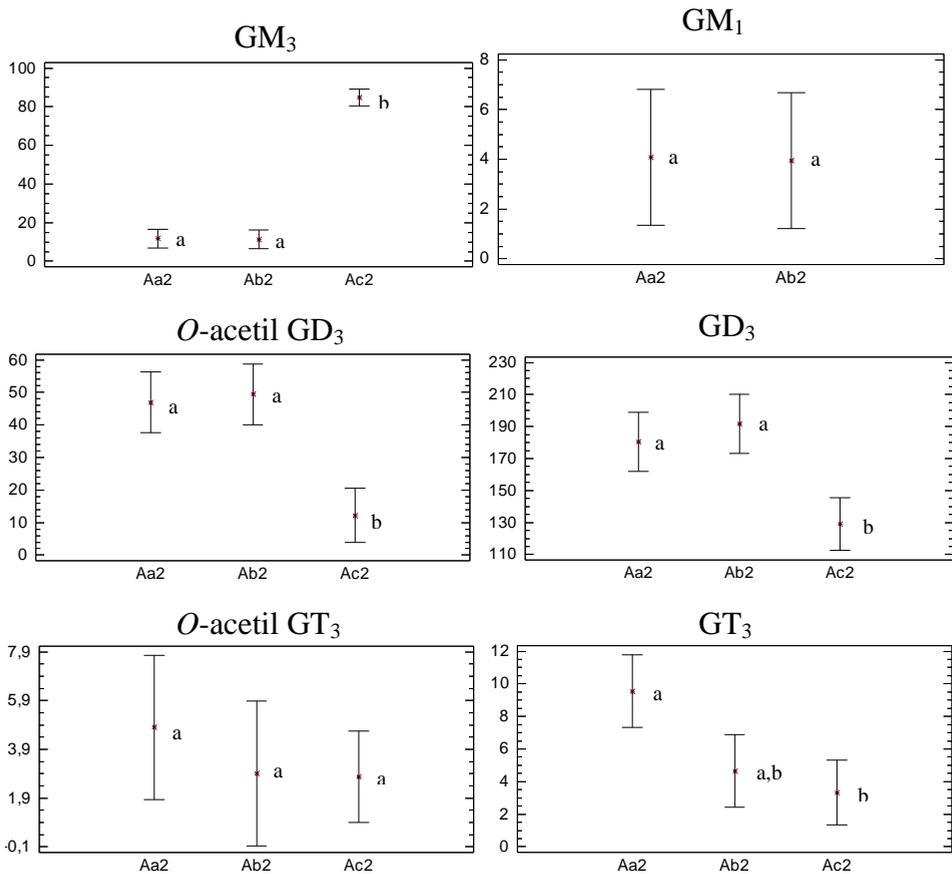
	<b>Lote</b>	<b>Aa2</b>	<b>Ab2</b>	<b>Ac2</b>
<b>GM<sub>3</sub></b>	<b>1</b>	4,34 ± 0,27	6,02 ± 0,05	38,87 ± 2,45
	<b>2</b>	4,72 ± 1,54	2,60 ± 0,65	33,20 ± 3,22
<b>GM<sub>1</sub></b>	<b>1</b>	1,77 ± 0,78	1,49 ± 0,04	n.d.
	<b>2</b>	n.d.	n.d.	n.d.
<b>O-acetil GD<sub>3</sub></b>	<b>1</b>	17,36 ± 0,07	14,41 ± 1,85	7,07 ± 2,29
	<b>2</b>	19,00 ± 1,54	23,50 ± 8,45	2,61 ± 0,83
<b>GD<sub>3</sub></b>	<b>1</b>	66,24 ± 0,04	77,08 ± 3,16	51,51 ± 0,15
	<b>2</b>	73,57 ± 0,16	69,22 ± 10,75	61,46 ± 0,19
<b>O-acetil GT<sub>3</sub></b>	<b>1</b>	2,04 ± 0,79	n.d.	1,33 ± 0,60
	<b>2</b>	n.d.	1,13 ± 1,59	1,00 ± 1,42
<b>GT<sub>3</sub></b>	<b>1</b>	4,97 ± 1,44	n.d.	1,23 ± 0,28
	<b>2</b>	2,70 ± 0,16	2,86 ± 1,03	1,73 ± 1,16
<b>G7</b>	<b>1</b>	2,00 ± 0,96	n.d.	n.d.
	<b>2</b>	n.d.	0,55 ± 0,78	n.d.
<b>G8</b>	<b>1</b>	1,28 ± 0,85	n.d.	n.d.
	<b>2</b>	n.d.	0,14 ± 0,20	n.d.
<b>G9</b>	<b>1</b>	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>2</b>	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. No detectado.

Las muestras Aa2 y Ab2 tienen como GG mayoritarios el GD<sub>3</sub> (66,2 – 77,1 %) y el O-acetil-GD<sub>3</sub> (14,4 – 23,5 %), presentando porcentajes similares a los encontrados en los PL. Los valores de GM<sub>3</sub> (2,6 – 6,0 %) y GT<sub>3</sub> (2,7 – 4,9 %) son más bajos que los obtenidos en los PL. Estos datos son similares a los descritos en la bibliografía (GD<sub>3</sub>: 72,1 – 80,3 %, GM<sub>3</sub>: 2,0 – 4,4 % y GT<sub>3</sub>: 1,1 – 10,1 %) (Sánchez-Díaz *et al.*, 1997).

La muestra Ac2 presenta un perfil muy distinto a los otros PC, con un 88,6% más de GM<sub>3</sub> que las muestras Aa2 y Ab2 y similar a los descritos en LH por Pan *et al.* (2000) (7 a 46 días lactación 27,72 %) e Iwamori *et al.* (2008) (3 a 4 días de lactación 29,2%). GD<sub>3</sub> y O-acetil GD<sub>3</sub> son un 10 y un 25%, respectivamente, inferiores a los porcentajes de estos GG en Aa2 y Ab2.

En la figura nº 27 se muestra el contenido de GG individuales en los PC analizados, calculado de la forma indicada anteriormente.



Distinta letra para cada gangliósido, indica que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

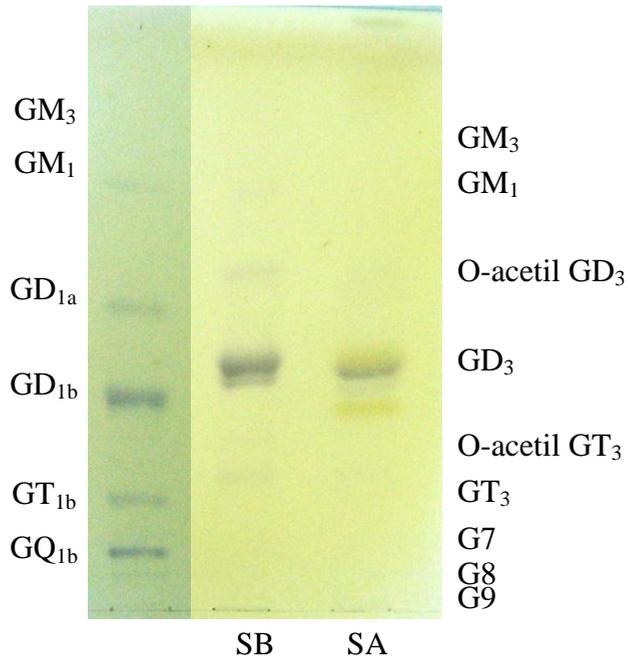
**Figura nº 27.** Contenido de gangliósidos individuales, expresado como intervalo de confianza de la media ( $\mu\text{g ASUL/L}$ ) en los preparados de continuación (test LSD).

Los contenidos de GG individuales siguen la misma pauta indicada anteriormente en los porcentajes. Aa2 y Ab2 tienen unos contenidos similares de GG, mientras que Ac2 tiene un alto contenido en GM<sub>3</sub> en detrimento de GD<sub>3</sub> y O-acetil GD<sub>3</sub>.

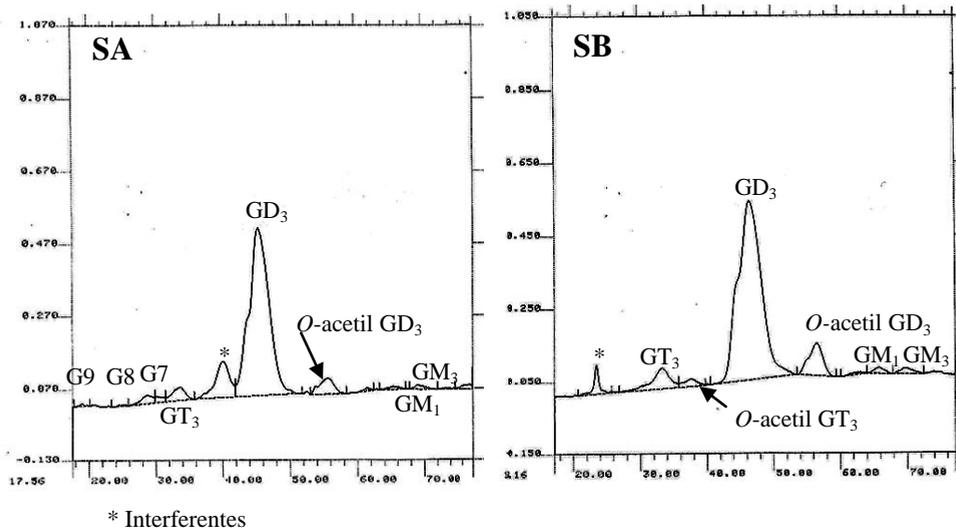
El ANOVA aplicado a las muestras indica que los contenidos de GG difieren estadísticamente entre muestras (PL > PC) a excepción de GM<sub>1</sub>.

- Sueros lácteos:

Los sueros presentan un perfil de GG similar al de los PL y PC (ver figuras n° 28 y 29).



**Figura n° 28.** Sueros lácteos. Identificación de gangliósidos por HPTLC.



**Figura n° 29.** Sueros lácteos. Densitogramas.

Los porcentajes relativos se recogen en el cuadro n° 32. Ambos ingredientes tienen al  $GD_3$  como más abundante,  $GG$  mayoritario de la leche de vaca. La riqueza en  $GM_3$  de SB no llega a explicar el alto porcentaje de  $GM_3$ , que contiene el PC Ac2, de modo que ese alto contenido se deberá a otros ingredientes de su composición.

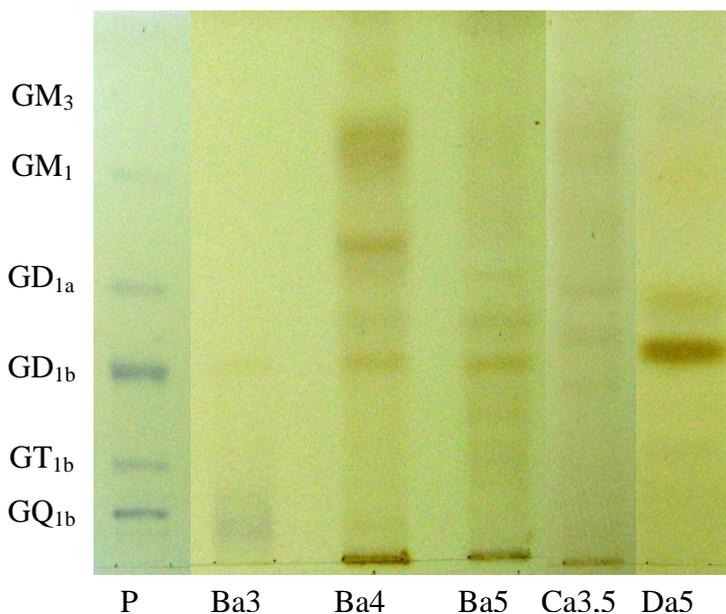
**Cuadro n° 32.** Sueros lácteos. Porcentajes relativos de gangliósidos.

	<b>SA</b>	<b>SB</b>
<b>GM<sub>3</sub></b>	1,82 ± 0,02	2,54 ± 1,07
<b>GM<sub>1</sub></b>	1,03 ± 0,07	0,21 ± 0,22
<b>O-acetil GD<sub>3</sub></b>	5,05 ± 1,56	8,07 ± 0,32
<b>GD<sub>3</sub></b>	86,95 ± 0,71	82,12 ± 2,04
<b>O-acetil GT<sub>3</sub></b>	n.d.	1,75 ± 0,17
<b>GT<sub>3</sub></b>	1,43 ± 0,02	5,31 ± 1,44
<b>G7</b>	2,55 ± 0,02	n.d.
<b>G8</b>	0,56 ± 0,47	n.d.
<b>G9</b>	0,61 ± 0,87	n.d.

n.d. No detectado.

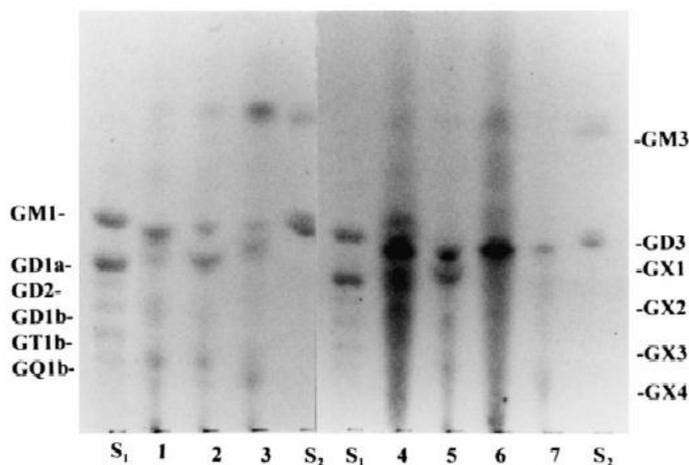
- Preparados especiales:

Como se observa en la figura n° 30 no se detectan GG. Dado que se observa una gran cantidad de interferentes por HPTLC, el resultado obtenido en la determinación de GG totales puede deberse a glúcidos ácidos que se hayan extraído.



**Figura n° 30.** Preparados especiales para lactantes. Identificación de gangliósidos por HPTLC.

Sólo se ha encontrado un trabajo en el que se cuantifican e identifican GG individuales en este tipo de preparados (Pan e Izumi, 2000). Los autores estudian dos preparados parcialmente hidrolizados, en las que obtienen 4,48 y 4,85 mg ASUL/L, valores altos, en comparación con PL y PC. Sin embargo, en la identificación por HPTLC (ver en la figura n° 31) no se obtiene una buena resolución, y la intensidad de color es muy alta comparando con las muestras de leche de vaca, PL y LH que estudian. Este hecho, unido a la falta de visualización de color, dificulta la interpretación de sus resultados.

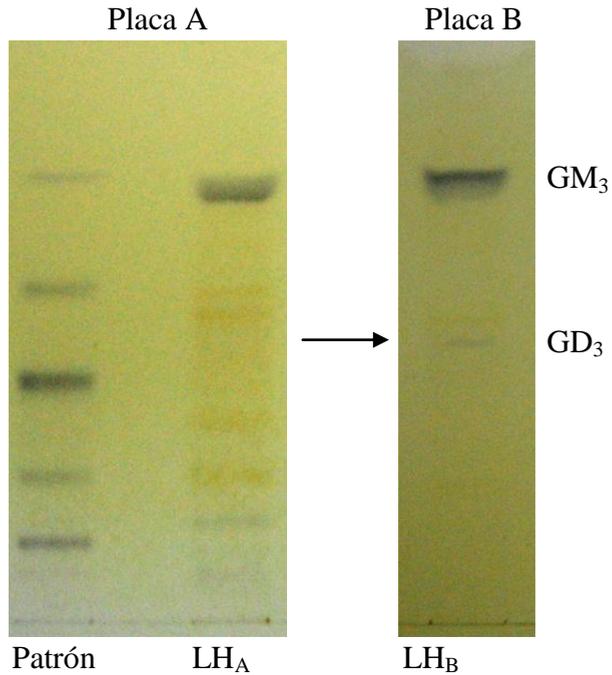


HPTLC de gangliósidos de leche humana, preparados para lactantes y leche. S1 mezcla estándar de gangliósidos de cerebro bovino (5 $\mu$ g); carril 1, leche humana a los 2 días post-parto; carril 2, leche humana a los 10 días post-parto, carril 3, leche humana a los 37 días post-parto; carril 4, preparado 1 (hidrolizado); carril 5, preparado 2; carril 6, preparado 3 (hidrolizado); carril 7, leche de vaca; S2, patrones de GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub> (4 $\mu$ g). Cada fracción de gangliósidos se prepara a partir de 0,2-0,3 mL de leche humana, o 0,4-0,6 mL de leche de vaca o preparados.

**Figura n° 31.** Preparados especiales para lactantes. Identificación de gangliosidos por HPTLC (Reproducido de Pan e Izumi, 2000).

- Leche humana:

En la figura n° 32 pueden observarse las correspondientes placas de HPTLC de los GG obtenidos de la LH. Se observan (placa A) contaminantes que distorsionan la banda de GD<sub>3</sub>. Por ello, se realiza una purificación con DEAE-Sephadex, como se indica en el apartado 3.2.2. En la placa B puede observarse el resultado de la muestra purificada, en la cual se realiza la medida por densitometría.



**Figura n° 32.** Leche humana. Identificación de gangliósidos por HPTLC, sin (placa A) o con (placa B) purificación con DEAE-Sephadex.

En LH únicamente se detectan GM<sub>3</sub> ( $97,49 \pm 0,09\%$ ) y GD<sub>3</sub> ( $2,52 \pm 0,92\%$ ). Estos valores son similares a los aportados por Takamizawa *et al.* (1986), quienes obtienen 84,4 y 8,5 % de GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub> respectivamente, para un periodo de lactancia similar a la LH estudiada.

## 5. Ingestas de gangliósidos

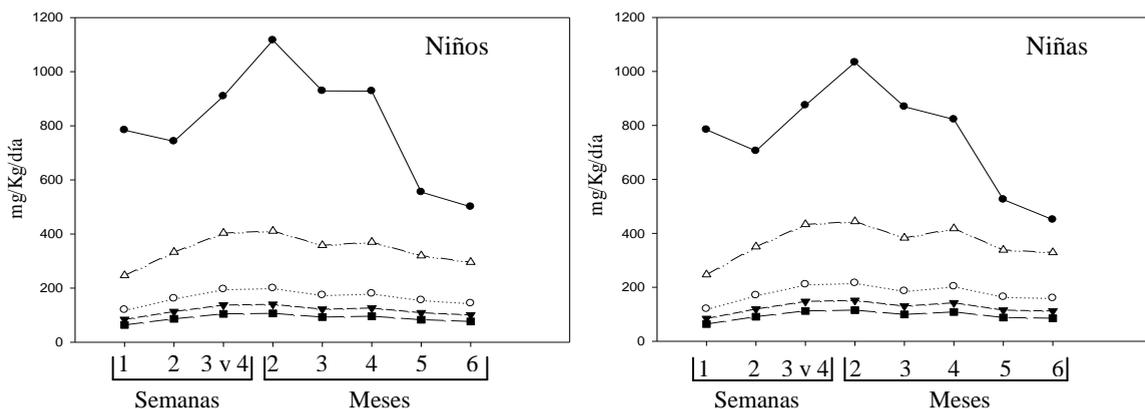
Se calculan las ingestas de GG del mismo modo que las del Sia (apartado 3 de resultados y discusión). Los resultados se muestran la figura nº 33.

No se han encontrado en la bibliografía datos sobre la ingesta de GG en neonatos alimentados con LH o PL.

Dado que se considera de interés comparar los datos de ingesta diaria de GG a través de alimentación artificial con los obtenidos por lactancia materna, se calculan las ingestas diarias de GG a partir de los contenidos de los mismos en LH. Para ello se toman como referencia los resultados obtenidos en un estudio sobre la evolución del contenido de GG a lo largo de 13 meses de lactancia (Takamizawa *et al.*, 1986) (ver figura nº 33).

En el caso de la ingesta de GG a partir de PL, en ningún caso se alcanza la proporcionada por la LH, si bien la que más se aproxima es la muestra adicionada de suero SB (Ac1).

La LH analizada en este trabajo proporciona un aporte de GG de  $293,1 \pm 7,7 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  (considerando la ingesta correspondiente a 5 meses), valor inferior al obtenido por Takamizawa *et al.* (1986) para el mismo periodo de lactancia, y similar al calculado para Ac1.



—●— LH calculada a partir de Carlson (1985); .....○..... Aa1; -▼- Ab1; -△- Ac1; —■— Ad1.

**Figura n° 33.** Ingestas diarias de gangliósidos a partir de preparados para lactantes.

Del estudio de ingestas de Sia y GG, cabe destacar que el único preparado que aporta una cantidad de estos compuestos cercana a la LH es la formulada con el suero SB (Ac1). Tal y como indican Pan e Izumi (2000) se podría considerar el enriquecimiento de los preparados con estos compuestos, para obtener contenidos y perfiles similares a los de la LH. Dada la importancia biológica de estos compuestos, las variaciones en composición encontradas entre los preparados y la LH podrían derivar en problemas en el desarrollo cerebral, crecimiento, alergias alimentarias y diarreas. Sin embargo, como se ha comentado, la EFSA evaluó negativamente la declaración de propiedad saludable, relativa al Sia como ingrediente activo del Lacprodan CGMP-10, en lo referente a su papel en el desarrollo cerebral para la mejora del aprendizaje y la memoria, aduciendo la falta de estudios causa-efecto que relacionen la ingesta dietética de Sia y la mejora del aprendizaje y la memoria en humanos (EFSA, 2009).

## **6. Ensayos de *Biodisponibilidad in vitro***

### **6.1 *Bioaccesibilidad***

Se estima la *bioaccesibilidad* del Sia y los GG en Ac1 y Ac2, preparados elaborados con SB, así como en LH.

Para la estimación de la *bioaccesibilidad*, se procede a una digestión gastrointestinal simulada descrita en el apartado 4.1 (de la parte experimental). Se analizan alícuotas de las etapas gástricas (DG) y la FB obtenida después de la digestión intestinal.

#### **6.1.1 Ácido siálico**

Los contenidos de Neu5Ac, Neu5Gc y Sia total de las muestras Ac1, Ac2 y LH, y en sus correspondientes DG y FB se muestran en el cuadro n° 33.

**Cuadro nº 33. Bioaccesibilidad.** Contenidos de ácido siálico (mg/L) en las muestras Ac1, Ac2 y LH sin digerir (SD), y sus respectivos digeridos gástricos (DG) y fracciones *bioaccesibles* (FB).

		Neu5Ac	Neu5Gc	Total	% <i>Bioaccesibilidad</i>
<b>Ac1<sup>a</sup></b>	<b>SD</b>	182,2 ± 8,5	3,3 ± 0,4	185,5 ± 8,5	
	<b>DG</b>	152,2 ± 0,8	3,5 ± 0,2	155,7 ± 0,8	
	<b>FB</b>	139,8 ± 2,0	2,9 ± 0,1	142,7 ± 2,0	76,9 ± 3,5
<b>Ac2<sup>b</sup></b>	<b>SD</b>	199,7 ± 7,5	4,9 ± 0,3	204,6 ± 7,5	
	<b>DG</b>	31,4 ± 3,4	1,3 ± 0,1	32,7 ± 3,4	
	<b>FB</b>	31,2 ± 1,3	1,4 ± 0,1	32,6 ± 1,3	15,9 ± 0,6
<b>LH<sup>c</sup></b>	<b>SD</b>	299,9 ± 7,8	2,1 ± 0,2	302,0 ± 7,5	
	<b>DG</b>	243,5 ± 6,8	1,8 ± 0,1	245,3 ± 6,8	
	<b>FB</b>	260,0 ± 12,1	2,2 ± 0,1	262,2 ± 12,1	86,8 ± 3,1

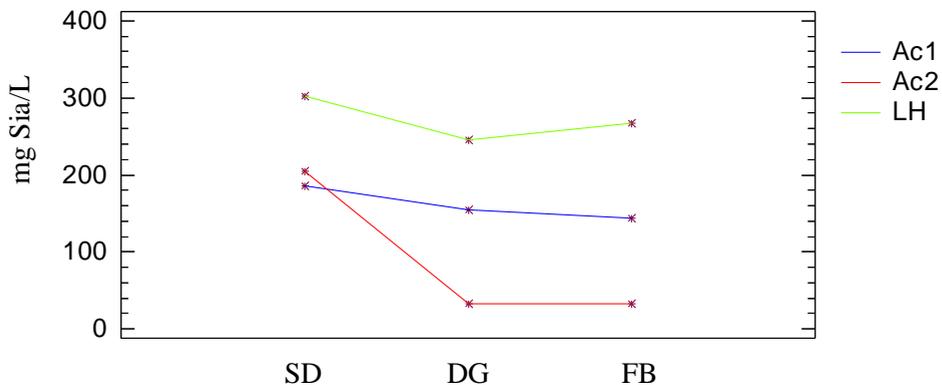
Distinta letra superíndice indica que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En todas las muestras analizadas, el Sia total disminuye significativamente ( $p < 0,05$ ) por efecto de la digestión gastrointestinal, llegando a una disminución del 23,1%, 84,1% y 13,2% para Ac1, Ac2 y LH, respectivamente. Por ello el orden de mayor a menor *bioaccesibilidad* es LH > Ac1 > Ac2.

Con el fin de confirmar el efecto del proceso de digestión sobre el contenido de Sia del conjunto de las muestras analizadas, se aplica un ANOVA de dos factores (muestra y etapa de la digestión). Se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Independientemente de las muestras, la digestión disminuye

significativamente el contenido total de Sia, no existiendo diferencias entre las etapas digestivas (DG=144,44 vs. FB=148,10 mg/L), con lo que la etapa gástrica es la que más influye durante la digestión.

Se detecta la existencia de interacción entre los factores considerados; el comportamiento de la muestra Ac2 difiere del resto, siendo esta muestra la que más pérdida sufre por el proceso de digestión gástrica, la disminución es de 23,1 y 15,0% para Ac1 y LH, respectivamente, mientras que para Ac2 es del 85,4% (ver figura n° 34).



**Figura n° 34.** Ácido siálico total. Interacción muestra-etapa de digestión.

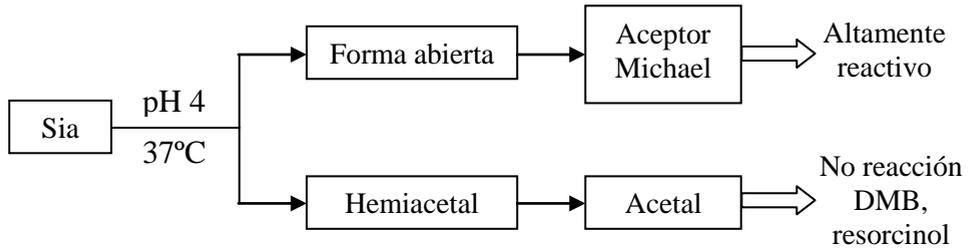
No se detecta ninguna de las dos formas de Sia (Neu5Ac y Neu5Gc) en la fracción no soluble, de modo que existe la posibilidad de una degradación del mismo.

No se conocen trabajos previos que evalúen la influencia de la digestión gastrointestinal en la *bioaccesibilidad* de Sia, si bien se ha estudiado la influencia de la hidrólisis, en condiciones ácidas moderadas o enzimáticas, en la liberación y estabilidad de Sia (Schauer & Corfield, 1982; Svennerholm, 1958). Svennerholm (1958) evalúa la estabilidad de las

formas acetilada (Neu5Ac) y glicolilada (Neu5Gc) del Sia en medio ácido utilizando distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,05, 0,1 y 0,2 N), temperaturas (80-90°) y tiempos (1 y 2 horas), obteniendo unas pérdidas entre 5 – 11% y 5,7 – 5,8%, respectivamente. La mínima pérdida la obtiene con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1N a 80°C, durante 1 hora, condiciones seleccionadas para la determinación de Sia total (formas libres y conjugadas) en el presente trabajo. Debe recordarse que el efecto de estas pérdidas, durante la determinación de Sia, se corrigen tratando patrones y muestras con las mismas condiciones de hidrólisis. Además, el autor indica que las pérdidas con HCl son superiores a las causadas por el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Por otra parte, Schauer & Corfield (1982) en una revisión sobre el efecto de la hidrólisis ácida sobre el Sia referencian pérdidas del 10%, valor cercano al obtenido por nosotros.

De ello se desprende que las pérdidas de Sia durante la digestión gastrointestinal en nuestro estudio son debidos no sólo al pH ácido de la etapa gástrica, sino a la presencia de HCl.

En estas condiciones de la etapa gástrica (pH 4 y 37°C), el Sia se encuentra en equilibrio entre las formas abiertas y hemiacetal. En la forma abierta por deshidrataciones se obtiene un sistema conjugado aceptor de Michael, altamente reactivo con proteínas (Vollhard, 2000). Dado que la muestra digerida es rica en proteínas, parte del Sia puede perderse por esa vía. También como producto de deshidratación del Sia (hemiacetal), puede formarse un acetal, que no reacciona ni con el DMB ni con el resorcinol (ver figura nº 35).



**Figura nº 35.** Reactividad ácido siálico en condiciones gástricas.

Así mismo debe tenerse en cuenta la variabilidad interdía (CV: 5,7% Neu5Ac, 4,3% Neu5Gc) que también influye en la cuantificación del Sia, dado que el porcentaje se calcula respecto a la muestra sin digerir.

En definitiva, la etapa gástrica es la que más afecta al contenido de Sia en las muestras, si bien es inexplicable el alto porcentaje de pérdidas del Sia en la muestra Ac2.

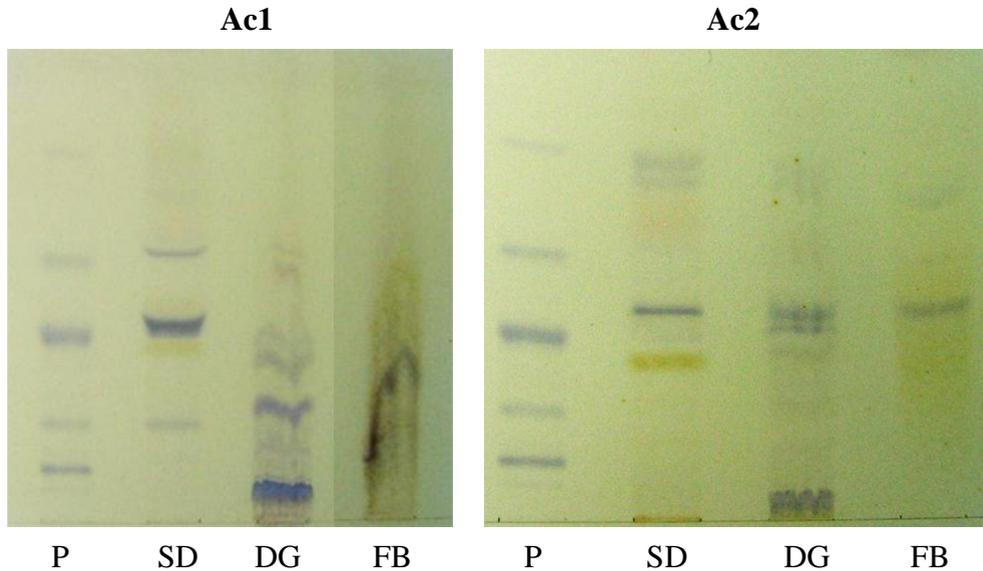
En referencia a la BD del Sia, Carlson y House (1986), en ensayos con ratas encuentran que la administración oral de Sia libre produce un aumento de GG y glicoproteínas en tejido cerebral. Sostienen que el Sia presente en los oligosacáridos y glicoproteínas de la leche, tras el proceso digestivo estaría disponible para ser sustrato de la síntesis de GG y glicoproteínas en el organismo.

### 6.1.2 Gangliósidos

- Ensayos preliminares

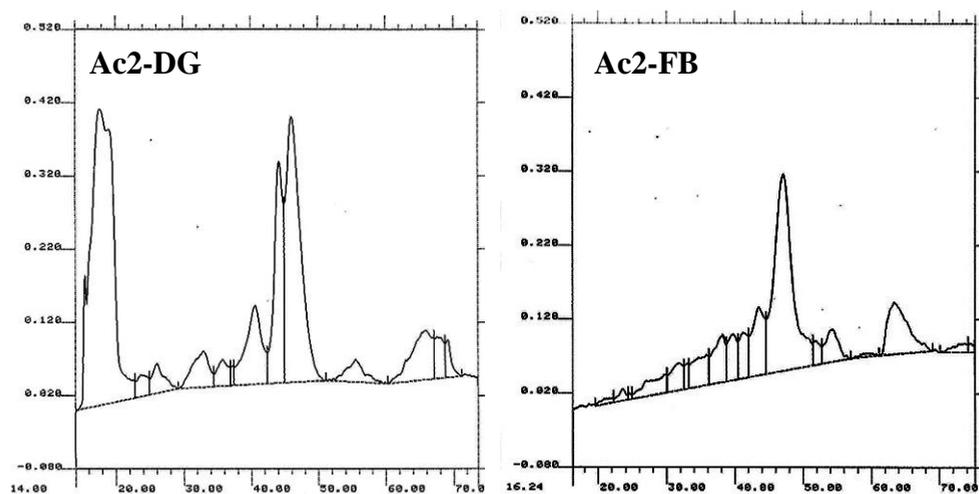
Se optimiza la purificación del extracto de GG procedente del DG y FB. Tras digerir ambas muestras, se extraen los GG de una alícuota de DG y

FB, se purifican mediante diálisis y se siembra una placa de HPTLC (ver figura n° 36).



**Figura n° 36.** Ensayos preliminares. Identificación de gangliósidos por HPTLC en Ac1 y Ac2 sin digerir (SD) y sus respectivos digeridos gástricos (DG) y fracciones *bioaccesibles* (FB), frente a patrón (P).

En la muestra Ac1, la FB contiene una gran cantidad de interferentes de color pardo, que dificultan la separación de los GG por HPTLC y por lo tanto impiden la determinación de ASUL. En el DG no se observan interferentes pardos, pero la resolución de las bandas no es clara; esto se atribuye a la presencia de partículas sólidas en el extracto, que junto al pequeño volumen del mismo, dificultan el depósito de la muestra en la placa. Para la muestra Ac2 ocurre lo mismo, si bien, la FB no contiene tantos interferentes. Por ello, en este caso se procede a la lectura de la placa por densitometría (ver figura n° 37). Se observa una falta de resolución que impide conocer el porcentaje relativo de GG.



**Figura n° 37.** Ensayos preliminares. Densitogramas de digestión gástrica (DG) y fracción *bioaccesible* (FB) de la muestra Ac2.

Para completar este ensayo preliminar se cuantifica el contenido total de GG, que se muestra en el cuadro n° 34. Se comprueba que los valores de GG en FB de Ac1 y Ac2 son superiores a los correspondientes para DG y muestra sin digerir, respectivamente. Todos estos resultados indican que es necesario una mayor purificación de los extractos, utilizando DEAE-Sephadex y extracción en fase sólida.

**Cuadro n° 34.** Ensayos preliminares. Contenido de gangliósidos (mg ASUL/L) en las muestras Ac1 y Ac2 sin digerir (SD) y sus respectivos digeridos gástricos (DG) y fracciones *bioaccesibles* (FB).

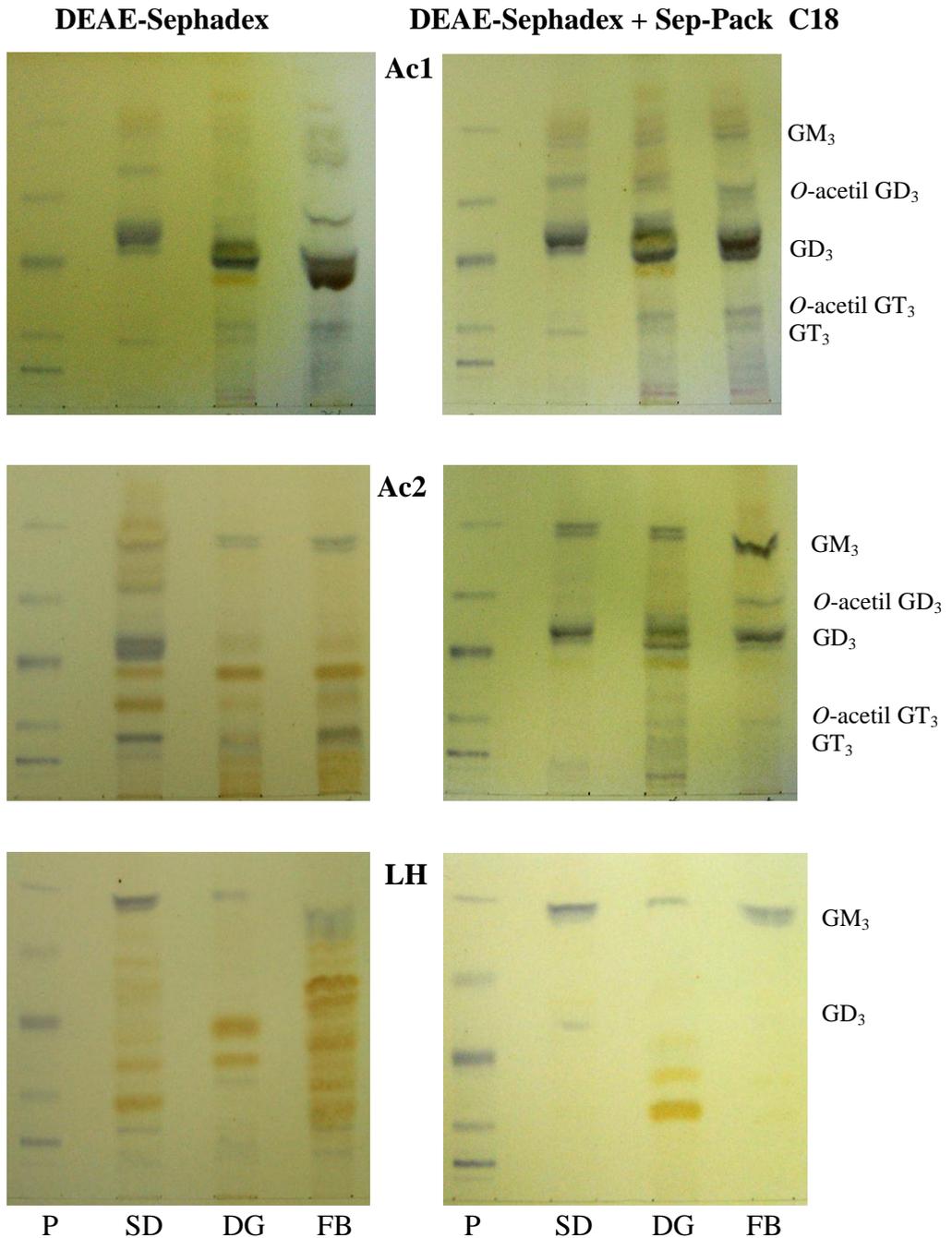
	<b>Sin digerir</b>	<b>DG</b>	<b>FB</b>
<b>Ac1</b>	2,17 ± 0,07	0,31 ± 0,01	0,68 ± 0,01
<b>Ac2</b>	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,50 ± 0,06

## - Identificación de gangliósidos por HPTLC

Tras extraer los GG de los digeridos de las muestras Ac1, Ac2 y LH, se realiza una purificación por diálisis, DEAE-Sephadex y Sep-Pack C18. En la figura nº 38 se muestran las placas correspondientes a las muestras indicadas tras la purificación por DEAE-Sephadex y Sep-Pack C18.

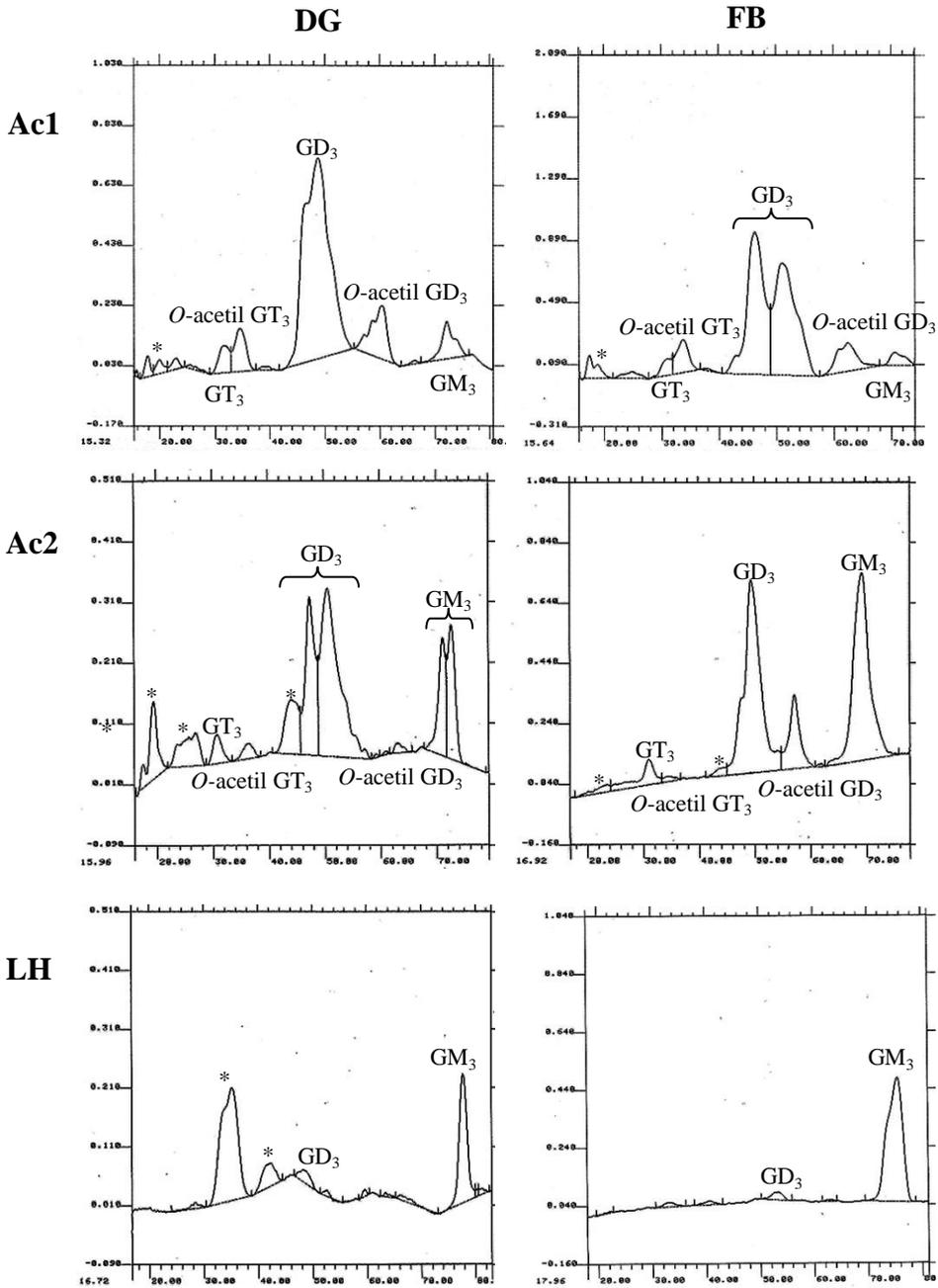
La purificación con DEAE-Sephadex mejora la resolución de las bandas, especialmente en el DG. Sin embargo, aparece una zona correspondiente a bandas azules “arrastradas” desde el depósito, especialmente en Ac1 que pueden corresponder a Sia hidrolizado y libre. Además se observan numerosas bandas parduzcas o amarillentas, en mayor medida en DG de Ac2 y LH, que corresponderían a lactosilceramida u otros glicoesfingolípidos neutros, inicialmente presentes en mayor cantidad en estas muestras.

Al pasar, posteriormente, las muestras por Sep-Pack C18 se eliminan gran parte de estos compuestos lo que ayuda a la mejor resolución de los GG; no obstante en el DG de las tres muestras sigue detectándose compuestos de color pardo entre las bandas de GD<sub>3</sub>, que pueden ser glicoesfingolípidos neutros (lactosilceramida y otros), o lactosa u oligosacáridos procedentes de los sueros. Alguna banda podría corresponder a fosfolípidos, las menos polares (más altas), pero es poco probable al ser bandas muy nítidas.



**Figura n° 38. Bioaccesibilidad.** Identificación de gangliósidos por HPTLC de Ac1, Ac2 y LH sin digerir (SD) y sus respectivos digeridos gástricos (DG) y fracciones *bioaccesibles* (FB) purificados por DEAE-Sephadex y Sep-Pack C18, frente a patrón (P).

En la figura n° 39 se muestran los densitogramas correspondientes a la DG y FB tras completar la purificación. En Ac1 y Ac2 se detectan cinco GG, como ocurre en las muestras sin digerir; mientras que en LH se detectan dos, al igual que en la muestra original. En el caso de Ac2, la banda correspondiente a GM<sub>3</sub> en la FB se observa muy irregular (ver figura n° 38) que, ajustando el densitómetro, es perfectamente medible (ver figura n° 39).



\*Interferentes

**Figura nº 39. Bioaccesibilidad.** Digestión gástrica (DG) y fracción *bioaccesible* (FB), purificadas por DEAE-Sephadex y Sep-Pack C18, de las muestras Ac1, Ac2 y LH. Densitogramas.

- Cuantificación de gangliósidos

En los cuadros nº 35 y 36 se recogen los contenidos totales, los porcentajes relativos y los contenidos individuales de los GG, en las muestras Ac1, Ac2 y LH, antes y después de la digestión.

**Cuadro n° 35.** Bioaccesibilidad. Contenidos y porcentajes relativos de gangliósidos en Ac1 y Ac2 sin digerir (SD), digerido gástrico (DG) y fracciones bioaccesibles (FB).

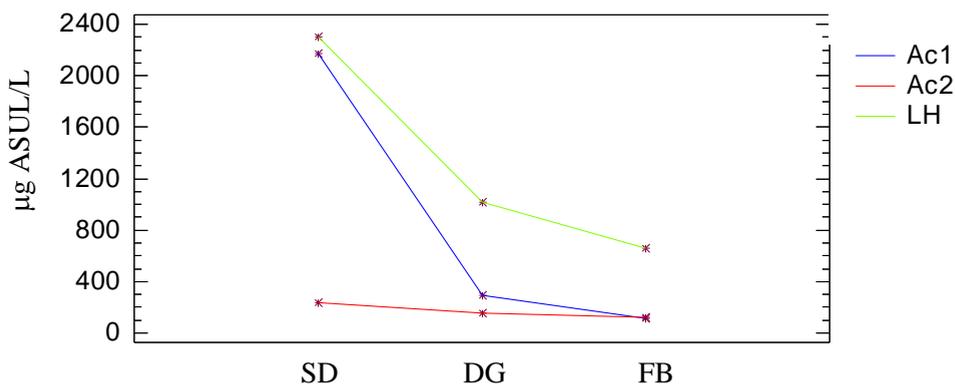
	Muestra	SD	DG	FB	% Bioaccesibilidad			
<b>Total ASUL (µg/L)</b>	Ac1	2172,3 ± 64,9	290,2 ± 22,2	115,2 ± 19,2	5,3 ± 0,9			
	Ac2	235,2 ± 4,4	157,1 ± 4,4	118,7 ± 4,1	50,5 ± 1,7			
<b>GM3</b>	Ac1	10,25 ± 3,03	222,4 ± 65,8	4,42 ± 1,78	12,8 ± 5,2	6,51 ± 2,04	7,8 ± 2,4	3,5 ± 1,1
	Ac2	36,04 ± 2,84	86,5 ± 6,8	25,97 ± 1,28	41,6 ± 2,0	40,89 ± 2,22	49,1 ± 2,7	56,8 ± 3,1
<b>O-acetil GD3</b>	Ac1	9,62 ± 1,92	208,8 ± 41,7	5,97 ± 4,49	17,3 ± 13,0	11,36 ± 2,12	13,6 ± 2,5	6,5 ± 1,2
	Ac2	4,84 ± 1,56	11,6 ± 3,7	6,23 ± 0,83	10,0 ± 1,3	10,74 ± 2,34	12,9 ± 2,8	111,2 ± 24,1
<b>GD3</b>	Ac1	72,73 ± 1,22	1578,2 ± 26,5	79,48 ± 1,45	230,5 ± 4,2	71,39 ± 1,37	85,7 ± 2,1	5,4 ± 0,1
	Ac2	56,49 ± 0,17	135,6 ± 0,4	61,78 ± 0,78	98,8 ± 1,2	44,56 ± 0,97	53,5 ± 1,2	39,5 ± 0,9
<b>O-acetil GT3</b>	Ac1	1,23 ± 0,45	26,7 ± 9,8	6,71 ± 0,77	19,5 ± 2,2	6,83 ± 0,62	8,3 ± 0,7	31,1 ± 2,6
	Ac2	1,17 ± 1,01	2,8 ± 2,4	2,49 ± 0,37	4,0 ± 0,6	n.d.	n.d.	0
<b>GT3</b>	Ac1	6,18 ± 2,76	134,1 ± 59,9	3,43 ± 0,49	9,7 ± 1,4	3,92 ± 0,64	4,7 ± 0,8	3,5 ± 0,6
	Ac2	1,48 ± 0,72	3,6 ± 1,7	3,53 ± 0,03	5,6 ± 0,1	3,81 ± 0,14	4,6 ± 0,02	127,8 ± 0,5

**Cuadro n° 36.** Bioaccesibilidad. Contenidos y porcentajes relativos de gangliósidos en LH sin digerir (SD), digerido gástrico (DG) y fracciones bioaccesibles (FB).

	SD		DG		FB		%Bioaccesibilidad	
	% relativo	ASUL (µg/L)	% relativo	ASUL (µg/L)	% relativo	ASUL (µg/L)	% relativo	ASUL (µg/L)
<b>Total ASUL (µg/L)</b>		2306,0 ± 31,2		1013,2 ± 64,2		661,3 ± 27,0		28,7 ± 1,2
<b>GM3</b>	97,48 ± 0,09	2232,2 ± 2,1	95,18 ± 3,91	970,8 ± 39,8	97,14 ± 2,24	718,8 ± 16,6		32,2 ± 0,7
<b>GD3</b>	2,52 ± 0,92	57,7 ± 21,1	4,82 ± 2,13	49,2 ± 21,7	2,86 ± 1,07	21,2 ± 7,9		36,7 ± 13,7

Para evaluar el efecto de la etapa digestiva, así como el tipo de muestra sobre el contenido de GG, se aplica un ANOVA de 2 factores. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para ambos factores, siendo el contenido distinto en cada una de las etapas, y en cada una de las muestras.

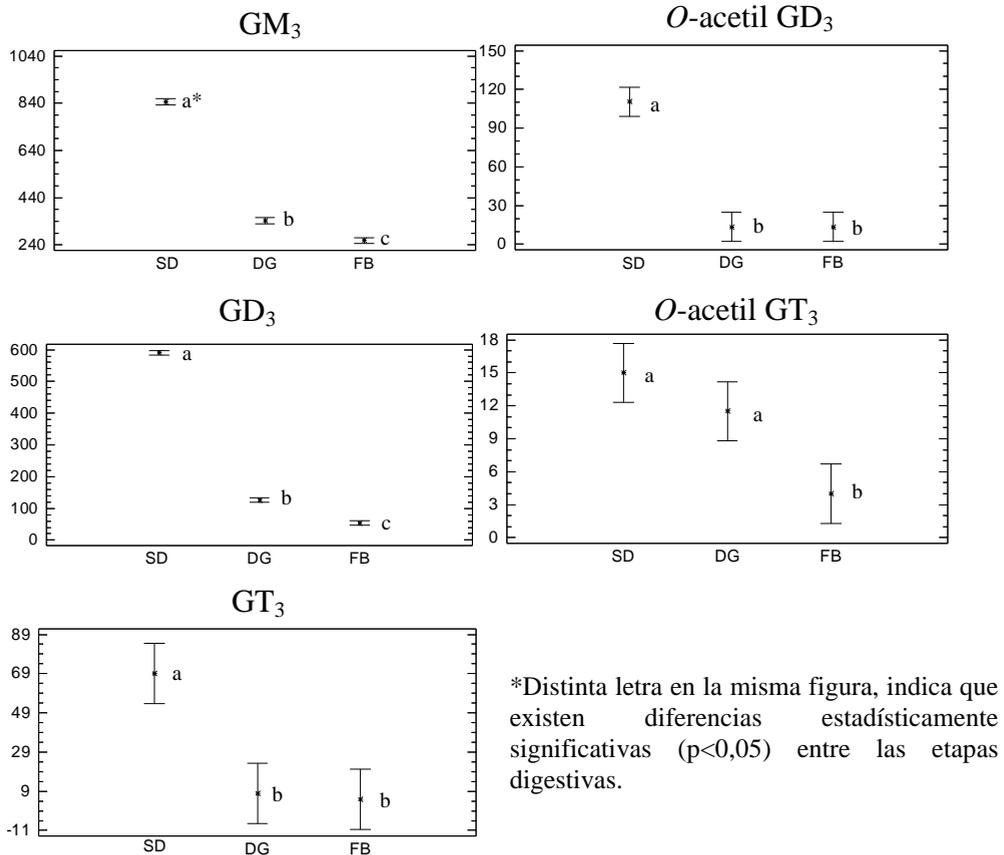
Existe una interacción significativa ( $p < 0,05$ ) entre la etapa de digestión y el tipo de muestra (ver figura nº 40). La etapa gástrica disminuye en mayor medida el contenido total de GG que la intestinal (% pérdida - Ac1: 86,6 vs. 58,6; Ac2: 33,3 vs. 25,0 y LH: 55,5 vs. 27,5). La muestra Ac2 es menos afectada por la digestión gastrointestinal, presentando mayor *bioaccesibilidad* (50,5%), que la LH (28,7%) y Ac1 (5,3%). No se detectan GG en la fracción no soluble.



**Figura nº 40.** Gangliósidos. Interacción muestra-etapa de digestion.

A pesar de las diferencias en los contenidos de GG en Ac1 y Ac2, estas diferencias no son tales en la FB. Los contenidos de GG en la FB de estas muestras son 5,5 veces inferiores al presente en la FB de la LH analizada.

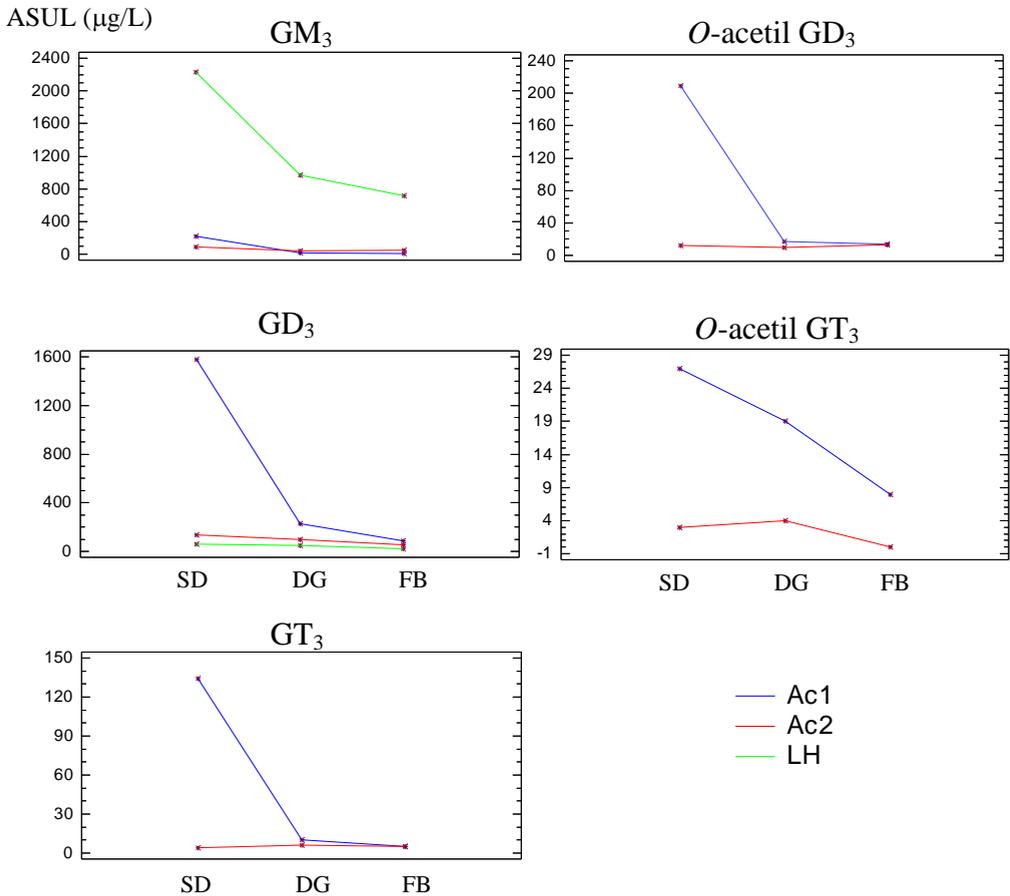
El efecto de la digestión gastrointestinal sobre el contenido total de GG queda reflejado en el contenido individual de ellos, excepto para el *O*-acetil GT<sub>3</sub> (ver figura nº 41).



**Figura nº 41.** Contenido de gangliósidos individuales, expresado como intervalo de confianza de la media (µg ASUL/L), en preparados infantiles y leche humana según la etapa digestiva (test LSD).

Existe una interacción significativa (p<0,05) entre la etapa de digestión y la muestra (ver figura nº 42). El efecto de la digestión gastrointestinal es dependiente del contenido individual de GG, afectando al

GM<sub>3</sub> en mayor medida en la LH, y al GD<sub>3</sub>, O-acetil GD<sub>3</sub>, GT<sub>3</sub>, O-acetil GT<sub>3</sub> en la Ac1.



**Figura n° 42.** Contenido total de gangliósidos individuales. Interacción muestra-etapa de digestión.

En la bibliografía no se han encontrado datos sobre el efecto de la digestión sobre los GG. Kawakami *et al.* (1994) estudian el efecto de pHs ácidos (1,3 – 4) utilizando distintas disoluciones de HCl y jugos gástricos sobre patrones de GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>. Observando que la cantidad de GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>

disminuye al bajar el pH, y la incubación con jugo gástrico produce disminuciones similares a las que obtienen a pH 1,3. A pH 4, utilizado en el presente trabajo para simular la etapa gástrica, obtienen un descenso del 10,9% y 12,7% de GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>, respectivamente. Estos valores son muy inferiores a nuestros resultados (GM<sub>3</sub>: 96,5, 43,2 y 67,8% para Ac1, Ac2 y LH, respectivamente; GD<sub>3</sub>: 94,6, 60,5 y 63,3% para Ac1, Ac2 y LH, respectivamente). Con los jugos gástricos encuentran descensos del 75% y 94,5% para GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>, respectivamente, que son valores más parecidos a los obtenidos en el presente trabajo.

Además Kawakami *et al.* (1994) encuentran que el GM<sub>3</sub> se transforma en su totalidad en LacCer y que la hidrólisis de GD<sub>3</sub> da lugar a una lactona y a LacCer. En la figura n° 38 en la que se muestran las placas de HPTLC de las tres muestras sin digerir, DG y FB, se puede observar que en los digeridos aparecen bandas de color pardo-amarillento, que probablemente sean LacCer generada por la hidrólisis de estos GG, si bien en nuestro caso no ha sido identificada ni confirmada. En cuanto a las lactonas de GD<sub>3</sub> no se observan en nuestras muestras digeridas.

Para completar su estudio, Kawakami *et al.* (1994) reincuban los GG a pH neutro (6,3-7,4) y observan que, a partir de las lactonas de GD<sub>3</sub>, se recupera el GD<sub>3</sub>. A estos pH, esta incubación se asemejaría a nuestra etapa intestinal (pH 6,5), aunque en nuestro caso no se observa una recuperación de éste, sino un mayor descenso. Esta diferencia, probablemente sea debida a que estos autores únicamente neutralizan el pH, mientras que en nuestro caso se simula la digestión intestinal, con la adición de las enzimas

características de esta etapa, que pueden romper las emulsiones de los GG, facilitando su hidrólisis.

## 6.2 Ensayos preliminares de *biodisponibilidad in vitro* (células Caco-2)

- Ácido siálico y gangliósidos totales

Se determina el contenido total de Sia (como suma de las formas Neu5Ac y Neu5Gc) y GG, así como el porcentaje de estos últimos en células Caco-2 no diferenciadas y diferenciadas. En el cuadro n° 37 se recogen los contenidos de Sia y GG totales, correspondientes a la media de dos ensayos independientes.

**Cuadro n° 37.** Contenido de ácido siálico y gangliósidos totales en células Caco-2 no diferenciadas y diferenciadas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína).

	No diferenciadas	Diferenciadas
<b>Neu5Ac</b>	$0,87 \pm 0,05^a$	$2,44 \pm 0,12^b$
<b>Neu5Gc</b>	n.d.	$0,033 \pm 0,003$
<b>Siálico total</b>	$0,90 \pm 0,06^a$	$2,47 \pm 0,12^b$
<b>ASUL</b>	$0,33 \pm 0,02^a$	$0,66 \pm 0,09^b$

Distinta letra superíndice, en una misma fila, indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). n.d., no detectado.

Las células diferenciadas presentan 2,7 veces más Sia total, que las no diferenciadas. La forma Neu5Gc únicamente es detectable en células diferenciadas. En no diferenciadas sí se observa un pico cromatográfico, con un área por debajo del LD.

Se comprueba mediante un inmunoensayo con anti-Neu5Gc que las células Caco-2 no diferenciadas contienen Neu5Gc, aunque a unos niveles que no permiten detectarlo por HPLC-fluorescencia. En la figura n° 43 puede observarse la presencia de una banda en la zona central correspondiente a esta forma de Sia.



**Figura n° 43.** Inmunoensayo con anti-Neu5Gc en células Caco-2 no diferenciadas.

No se ha encontrado en la bibliografía ningún trabajo en el que se indiquen los contenidos de Sia en células Caco-2 o similares. Bardor *et al.* (2005) detectan la presencia de Neu5Gc en Caco-2, que atribuyen al origen cancerígeno de esta línea celular.

En células diferenciadas los GG totales son 2 veces superiores a los contenidos en células no diferenciadas. Schnabl *et al.* (2009a) utilizando Caco-2 de la colección americana de cultivos tipo, con un pase similar al nuestro (44-54), obtiene una relación parecida (diferenciadas/no diferenciadas = 2,5), si bien los contenidos totales de ASUL son superiores

a los del presente estudio (0,75 y 1,73  $\mu\text{g}$  ASUL/mg proteína en células no diferenciadas y diferenciadas, respectivamente). Estas diferencias en los contenidos totales podrían atribuirse a la variabilidad típica asociada a tejidos vivos, lo que justifica el interés de caracterizar el cultivo a utilizar en posteriores estudios sobre efectos biológicos. También deben considerarse las distintas condiciones del cultivo (origen, medios de cultivo utilizados, etc).

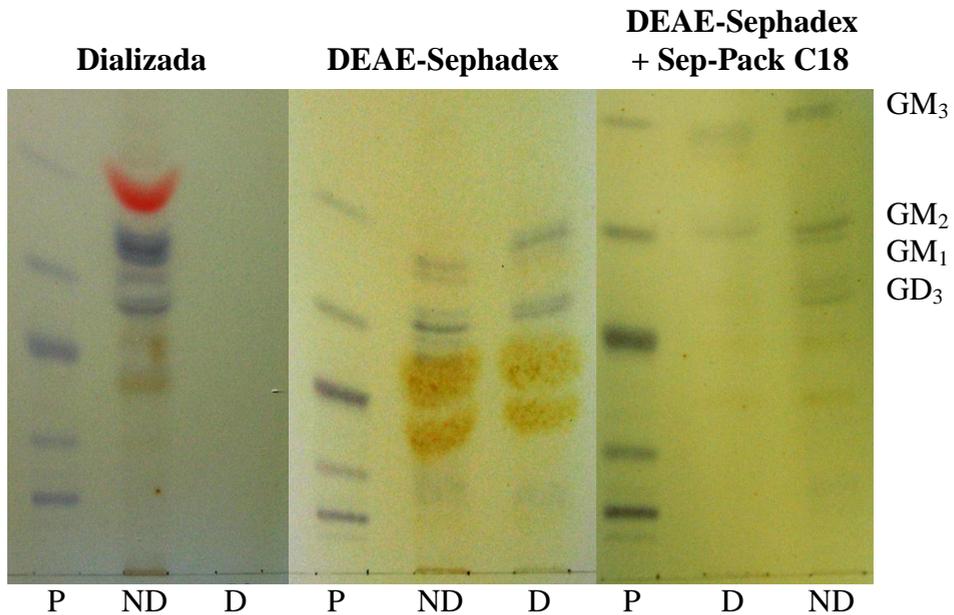
Hay poca información sobre el contenido total de GG en el intestino humano. Holgersson *et al.* (1988) obtienen 43,3 y 40,2-20,1 mg ASUL/g en peso seco, para el íleon y el colon ascendente, respectivamente. Park *et al.* (2005) evalúan el contenido total de GG en el intestino delgado de rata, obteniendo 49  $\mu\text{g}$  ASUL/mg peso húmedo. En estos casos al no indicar el contenido proteico, no se pueden comparar con los resultados obtenidos para la línea celular Caco-2.

#### - Caracterización de gangliósidos

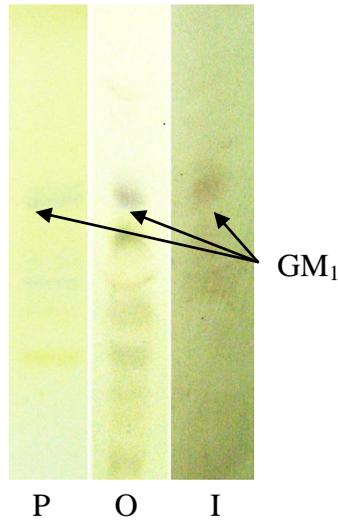
Para la caracterización de los GG individuales es necesaria la purificación del extracto de GG por DEAE-Sephadex y Sep-Pack C18. En la figura nº 44 se muestran las placas de HPTLC de las células Caco-2 no diferenciadas y diferenciadas, en las distintas etapas de purificación.

En los ensayos de HPTLC, el extracto dializado presenta una banda roja correspondiente al medio de cultivo en células no diferenciadas. Tras purificar con DEAE-Sephadex, se elimina la banda roja, la resolución de los GG mejora, sin llegar a ser suficiente. Por ello, se procede a la purificación

con Sep-Pack C18, lo que mejora notablemente la resolución. Una vez purificados los extractos, se identifican en ambas muestras GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>. Entre estos dos GG se aprecian dos bandas que podrían corresponder a una doble banda de GM<sub>1</sub>, o a GM<sub>2</sub> (banda superior) y GM<sub>1</sub> (banda inferior). Se confirma mediante inmunoensayo con un anticuerpo monoclonal, anti-GM<sub>1</sub>, que la banda inferior corresponde a éste (ver figura n° 45); por datos existentes en la bibliografía se atribuye la banda superior a GM<sub>2</sub> (Bouhours *et al.*, 1993).



**Figura n° 44.** Identificación de gangliósidos en células Caco-2 no diferenciadas (ND) y diferenciadas (D) frente a patrón de gangliósidos (P).



**Figura n° 45.** Placas reveladas con orcinol (P, patrón; O, muestra) e inmunoensayo con anti-GM<sub>1</sub> (I).

En el cuadro n° 38 se recogen los porcentajes relativos y la estimación de los contenidos de los distintos GG, en células Caco-2 no diferenciadas y diferenciadas.

**Cuadro n° 38.** Contenidos y porcentajes relativos de gangliósidos en células Caco-2 no diferenciadas y diferenciadas.

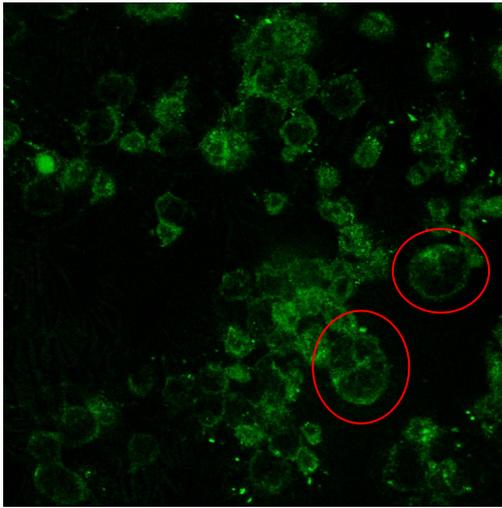
	No diferenciadas		Diferenciadas	
	% relativo	µg ASUL/mg proteína	% relativo	µg ASUL/mg proteína
<b>GM<sub>3</sub></b>	72,8 ± 8,2	0,24 ± 0,03 <sup>a</sup>	48,0 ± 5,2	0,32 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>GM<sub>2</sub></b>	5,8 ± 3,9	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,9	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>GM<sub>1</sub></b>	14,6 ± 4,2	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	14,7 ± 2,7	0,10 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>GD<sub>3</sub></b>	6,8 ± 0,2	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	35,2 ± 4,2	0,23 ± 0,03 <sup>b</sup>

Distinta letra superíndice, en una misma fila, indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

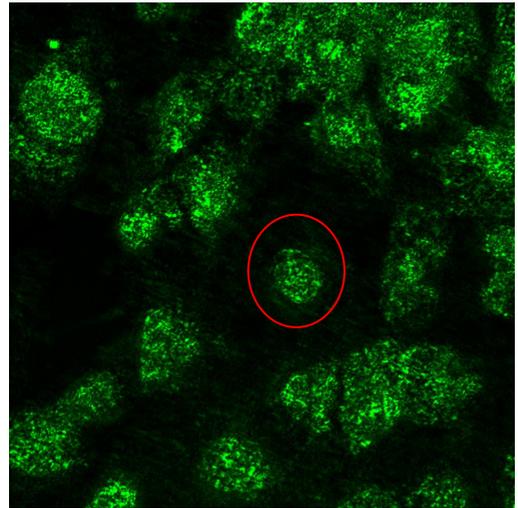
Las células no diferenciadas contienen mayoritariamente GM<sub>3</sub>, seguido de GM<sub>1</sub>, GD<sub>3</sub> y GM<sub>2</sub>. Al diferenciarse aumenta principalmente GD<sub>3</sub>, en menor medida GM<sub>1</sub> y GM<sub>3</sub>, no variando el contenido de GM<sub>2</sub>. GM<sub>3</sub> sigue siendo el gangliósido mayoritario, seguido por GD<sub>3</sub>, GM<sub>1</sub> y GM<sub>2</sub>. La relación GM<sub>3</sub>:GD<sub>3</sub> es de 10,70 y 1,36 para células no diferenciadas y diferenciadas, respectivamente.

Schnabl *et al.* (2009a), al igual que ocurre en el presente trabajo, considerando los porcentajes, observan, al diferenciarse las células, el aumento de GD<sub>3</sub> y los descensos de GM<sub>3</sub> y GM<sub>2</sub>. Estos hechos les lleva a hipotetizar que las células Caco-2 diferenciadas sobreexpresan la enzima SAT II, la cual favorece la conversión de GM<sub>3</sub> en GD<sub>3</sub>, acompañado de la hidrólisis de GM<sub>2</sub>, que contrarresta parte de la depleción de GM<sub>3</sub>.

Para comprobar la localización de los GG mayoritarios (GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>), en las células Caco-2, se realizan ensayos de microscopía de fluorescencia confocal, cuyas imágenes se muestran en la figura n° 46.



**GM<sub>3</sub>**



**GD<sub>3</sub>**

**Figura n° 46.** Microscopía confocal de fluorescencia de las células Caco-2 diferenciadas.

GM<sub>3</sub> se localiza en la membrana apical, mientras que GD<sub>3</sub> lo hace en la basolateral. Los resultados concuerdan con los descritos por Park *et al.* (2005a) para intestino de rata. Estos autores sugieren que la diferente localización de estos GG contribuye a las funciones biológicas de protección y desarrollo atribuidas a cada uno de ellos. De este modo, el GM<sub>3</sub> está relacionado con la intercepción e inactivación de enterobacterias, como resultado de su exposición directa al lumen intestinal; por tanto actúa en primera línea defensiva frente a microorganismos patógenos. Por otra parte, GD<sub>3</sub> se relaciona con la estimulación del sistema inmune, ya que su localización da acceso a los factores inmunológicos presentes en la lámina propia del intestino.

## - Ensayo de viabilidad

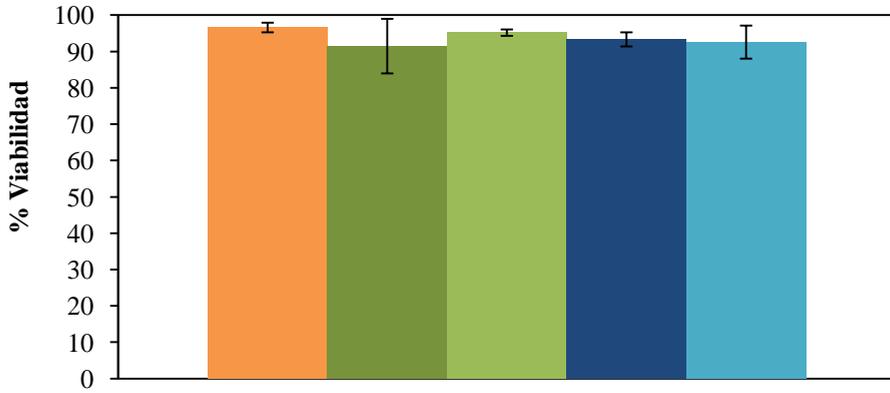
Como paso previo a los ensayos de BD, se realizan ensayos de viabilidad celular e integridad mitocondrial en presencia GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>, mayoritarios en LH y preparados destinados a la alimentación infantil. Se ensayan dos concentraciones, correspondientes a la mínima y máxima presentes en las FB, a 2 y 24 horas. En las figuras n° 47 y 48 se muestran los resultados.

La viabilidad celular así como la actividad mitocondrial no quedan afectadas por su exposición a GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>, en las condiciones estudiadas.

Schnabl *et al.* (2009b) determinan mediante el ensayo de azul tripán que GD<sub>3</sub> no es citotóxico en un intervalo de 0 a 64 µg/ml, durante 24 horas de exposición. Ensayan esas concentraciones tomando como referencia el contenido de GD<sub>3</sub> en LH. En nuestro caso se ensayan concentraciones mucho más bajas (0,04 y 0,08 µg/ml), ya que se toman como referencia la FB de la LH y los preparados infantiles.

Estos ensayos preliminares aportan datos necesarios para realizar futuros estudios sobre BD y otros efectos biológicos de interés (efectos apoptóticos, estimulación del sistema inmunitario, etc) en Caco-2.

### 2horas



### 24 horas

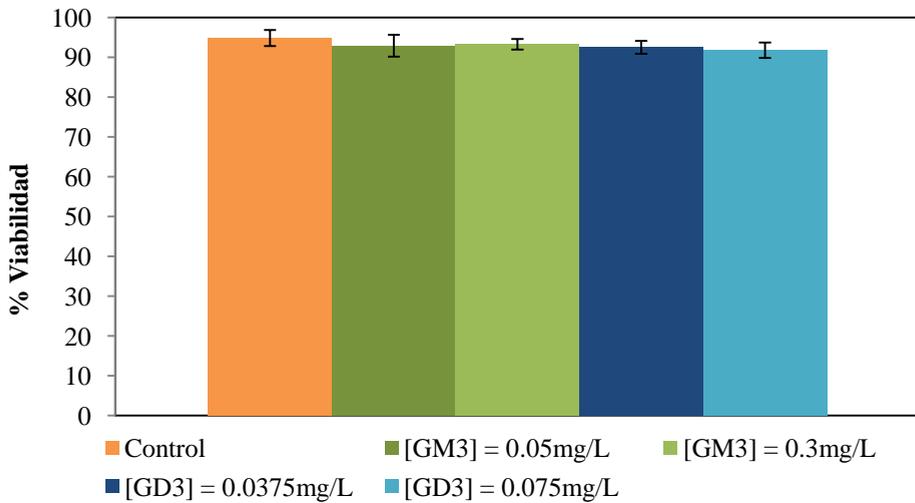


Figura n° 47. Ensayo de viabilidad celular con azul tripán.



## **CONCLUSIONES**

El trabajo realizado permite concluir que:

1. Los parámetros analíticos de los métodos propuestos para la determinación de ácido siálico, por cromatografía líquida de alta resolución o espectrofotometría, indican su idoneidad para ser aplicados a productos lácteos destinados a la alimentación del lactante así como a la leche humana. El método de elección es la cromatografía líquida de alta resolución, por permitir la cuantificación diferenciada de Neu5Ac y Neu5Gc, además de su mayor sensibilidad y rapidez.

2. El suero lácteo elaborado a partir de membranas de glóbulos grasos de la leche presenta un contenido de ácido siálico y gangliósidos superior al elaborado con  $\alpha$ -lactoalbúmina.

3. En general, los preparados para lactantes tienen la misma cantidad de Neu5Ac que los de continuación, pero un menor contenido de Neu5Gc.

4. No se observa un incremento del contenido de ácido siálico y gangliósidos en los preparados infantiles elaborados con el suero lácteo a base de  $\alpha$ -lactoalbúmina.

5. Los preparados para lactantes y de continuación elaborados con suero lácteo a base de membranas de glóbulos grasos de la leche son los que presentan mayores contenidos de Neu5Ac y gangliósidos, asemejándose el perfil de gangliósidos de los preparados de continuación al de la leche humana.

6. Los preparados destinados a la alimentación infantil analizados tienen un perfil similar de gangliósidos, si bien el contenido de estos es mayor en los preparados para lactantes.

7. Las ingestas de ácido siálico y gangliósidos a partir de preparados para lactantes, no alcanzan las aportadas por la leche humana durante las primeras semanas de vida, si bien a partir de la cuarta semana las ingestas de ácido siálico son similares en ambos casos.

8. De los ensayos de digestión gastrointestinal simulada se concluye que la etapa gástrica es la principal responsable de la reducción de la *bioaccesibilidad* del ácido siálico y gangliósidos, comprobándose que no es debido a la insolubilización de los mismos.

9. El ácido siálico se encuentra más *bioaccesible* en la leche humana, seguida del preparado para lactantes y el preparado de continuación. En el caso de los gangliósidos, el preparado de continuación es el que presenta una mayor *bioaccesibilidad*, seguido de la leche humana y el preparado para lactantes.

10. Se comprueba la ausencia de citotoxicidad en células Caco-2 de los gangliósidos GM<sub>3</sub> y GD<sub>3</sub>, a concentraciones similares a las obtenidas en las fracciones *bioaccesibles* de la leche humana y los preparados para lactantes.

11. El conocimiento del contenido de ácido siálico y gangliósidos, así como la distribución de estos últimos, en la línea celular Caco-2, permite la realización de futuros estudios de *biodisponibilidad* de estos compuestos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abad-Rodríguez J y Robotti A. **2007**. Regulation of axonal development by plasma membrane gangliosides. *Journal of Neurochemistry*. 103, 47-55.

Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I. **2006**. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Disease in Childhood*. 91, 39-45.

Aminoff D. **1961**. Methods for the quantitative estimation of *N*-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochemistry Journal*. 81, 384-392.

Analytical Methods Committee. **1987**. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst*. 112, 199-204.

Anderson JW, Johnstone BM, Remley DT. **1999**. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 70, 525-535.

Ando S, Chang NC, Yu RK. **1978**. High-performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species. *Analytical Biochemistry*. 89, 437-450.

Angata T y Varki A. **2002**. Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: An evolutionary perspective. *Chemical Reviews*. 102, 439-469.

Annumula KR. **1995**. Rapid quantitative determination of sialic acids in glycoproteins by high-performance liquid-chromatography with a sensitive fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*. 230, 24-30.

Argyri K, Komaitis M, Kapsokefalou M. **2006**. Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*. 96, 281-289.

Azenha M y Vasconcelos M. **2000**. Assessment of the Pb and Cu in vitro availability in wines by means of speciation procedures. *Food Chemistry and Toxicology*. 38, 899-912.

Barberá R y Farré R. **1992**. Bioavailability of trace-elements-review. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 32, 381-399.

Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. **2005**. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *Journal of Biological Chemistry*. 280, 4228-4237.

Becker K y Rahmann H. **1995**. Influence of ambient temperature on content and composition of brain gangliosides in vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 111, 299-310.

Blix G, Gottschalk A, Klenk E. **1957**. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature*. 179, 1088.

Blix G. **1936**. Ueber die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarismucins. *Hoppe-Seyler's Z Physiological Chemistry*. 240, 43-54.

Bouhours JF, Bouhours D, Hansson GC. **1993**. Developmental changes of glycosphingolipid composition of epithelia of rat digestive tract. *Advances in Lipid Research*. 26, 353-372.

Byres E, Paton AW, Paton JC, Löfling JC, Smith DF, Wilce

MCJ, Talbot UM, Chong DC, Yu H, Huang S, Chen X, Varki NM, Varki A, Rossjohn J, Beddoe T. **2008**. Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature*. 456, 648-652.

Cabezas JA, Reglero A, García-Alonso J, Rodrigo M, Martínez-Zorzano VS, Cabezas-Delamare M, Fitt H, Hueso P. **1989**. Gangliósidos: datos recientes sobre sus características, funciones y aplicaciones terapéuticas. *Jano*. 870, 43-49.

Carlson SE. **1985**. *N*-Acetylneuraminic acid concentrations in human-milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*. 41, 720-726.

Carlson SE, House SG. **1986**. Oral and intraperitoneal

administration of *N*-acetylneuraminic acid: effect on rat cerebral and cerebellar *N*-acetylneuraminic acid. *The Journal of Nutrition*. 121, 881-886.

Cattaneo A, Yngve A, Koletzko B, Ruíz L. **2005**. Protection, promotion and support of breastfeeding in Europe: current situation. *Public Health Nutrition*. 8, 39-46.

Caussy D. **2003**. Case studies of the impact of understanding bioavailability; arsenic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56, 164-173.

Chien PF y Howie PW. **2001**. Breast milk and the risk of opportunistic infection in infancy in industrialized and non-industrialized settings. *Advances in Nutrition Research*. 10, 69-104.

Cilla A. **2009**. Tesis doctoral: Actividad antioxidante y biodisponibilidad mineral de zumos de frutas adicionados de minerales y/o leche. Valencia.

Colarow L, Turini M, Teneberg S, Berger A. **2003**. Characterization and biological activity of gangliosides in buffalo milk. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1631, 94-106.

Contreras JC. **2008**. Tesis Doctoral: Utilidad de indicadores de pardeamiento químico para el control de ingredientes y fórmulas infantiles. Granada.

Crews HM, Burrell JA, McWeeny DJ. **1983**. Preliminary enzymolysis studies on trace element extractability from food. *Journal of Science Food Agricultural*. 34, 997-1004.

Crook M, Haq M, Tutt P. **1993**. Evaluation of three assays for the

determination of serum total sialic acid. *Clinical Biochemistry*. 26, 449-454.

Der G, Batty GD, Deary IJ. **2006**. Effect of breast feeding on intelligence in children: prospective study, sibling pairs analysis, and meta-analysis. *British Medical Journal*. 333, 929-30.

Dewettinck K, Rombaut R, Thienpont N, Trung Le T, Messens K, Van Camp J. **2008**. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*. 18, 436-457.

Dewey KG. **2003**. Is breastfeeding protective against child obesity?. *Journal of Human Lactation*. 19, 9-18.

Dickson JJ y Messer M. **1978**. Intestinal neuraminidase activity

of suckling rats and other mammals. Relationship to the sialic acid content of milk. *Biochemistry Journal*. 170:407–13.

Directiva 2006/141/CE de la Comisión, de 22 de diciembre relativa, a los preparados para lactantes y preparados de continuación por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 401, 1-33.

Distler U, Hülsewig M, Souady J, Dreisewerd K, Haier J, Senninger N, Friedrich AW, Karch H, Hillenkamp F, Berkenkamp S, Katalinic JP, Müthing J. **2008**. Matching IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry with the TLC overlay binding assay and its clinical application for tracing tumor-associated glycosphingolipids in hepatocellular and pancreatic

cancer. *Analytical Chemistry*. 80, 1835-1846.

Dreisewerd K, Müthing J, Rohlfing A, Meisen I, Vukeli Z, Katalinic JP, Hillenkamp H, Berkenkamp S. **2005**. Analysis of gangliosides directly from thin-layer chromatography plates by infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix. *Analytical Chemistry*. 77, 4098-4107.

Ebel F, Schmitt E, Peter-Katalinic J, Kniep B, Muehlradt PF. **1992**. Gangliosides: differentiation markers for murine T helper lymphocyte subpopulations T<sub>H1</sub> and T<sub>H2</sub>. *Biochemistry*. 31, 12190-12197.

Echten-Deckert G y Hergert T. **2006**. Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1758, 1978-1994.

Edwards KA y March JC. **2007**. GM<sub>1</sub>-functionalized liposomes in a microtiter plate assay for cholera toxin in *Vibrio cholerae* culture samples. *Analytical Biochemistry*. 368, 39-48.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. **2009**. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to sialic acid and learning and memory (ID 1594) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006 on request from the European Commission. *EFSA Journal*. 7, 1277-1285.

Ekmekcioglu C. **2002**. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*. 76, 225-230.

Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. **2000**.

Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 1589-1596.

ESPGHAN (European Society of Pediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition). Committee on nutrition. **1990**. Comment on the composition of cow's milk based follow-up formulas. *Acta Paediatrica Scandinava*. 79, 250-254.

ESPGHAN (European Society of Pediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition). Committee on nutrition **2005**. Global standard for the composition of infant formula: Recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 41, 584-599.

ESPGHAN (European Society of Pediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition). Committee on nutrition **2009**. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 49, 112-125.

Fahr C y Schauer R. **2001**. Detection of sialic acids and gangliosides with special reference to 9-O-acetylated species in basaliomas and normal human skin. *Journal of Investigation in Dermatology*. 116, 254-260.

Fairweather-Tait SJ. **1996**. Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutrition Research Review*. 9, 295.

Ferreira L, Villar E, Muñoz-Barroso I. **2004**. Gangliosides and N-glycoproteins function as

Newcastle disease virus receptors. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36, 2344-2356.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. **1977**. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*. 59, 221-226.

Folch J, Lees MB, Stanley GH. **1957**. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226, 497-509.

García-Onieva M. **2007**. Lactancia artificial: técnica, indicaciones, formulas especiales. *Pediatría Integral*. 7, 318-326.

Gartner LM, Morton J, Lawrence RA. **2005**. Breastfeeding and the use of human milk. American Academy of Pediatrics Section on

Breastfeeding. *Pediatrics*, 115, 496-506.

Giocondi M, Yamamoto C, Lesniewska D, Milhiet E, Ando P, Le Grimellec P. **2010**. Surface topography of membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1798, 703-718.

Gupta M, Schwarz J, Chen XL, Roisen FJ. **1990**. Gangliosides prevent MPTP toxicity in mice: An immunocytochemical study. *Brain Research*. 527, 330-334.

Haile Y, Haastert K, Cesnulevicius K, Strummeyer K, Timmer H. **2007**. Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid. *Biomaterials*. 28, 1163-1173.

Hara S, Yamaguchi M, Takemori Y. **1986**. Highly sensitive determination of *N*-acetyl- and *N*-

glycolylneuraminic acids in human serum and urine and rat serum by reverse-phase liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 377, 111-119.

Hara S, Takemori Y, Yamaguchi M, Nakamura M, Ohkura Y. **1987**. Fluorometric high-performance liquid-chromatography of *N*-Acetylneuraminic and *N*-Glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Analytical Biochemistry*. 164, 138-145.

Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Kagatiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. **2007**. Study on the quality control of cell therapy products determination of *N*-glycolylneuraminic acid  
218

incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1160, 263-269.

Hata Y, Murakami M, Okabe S. **2005**. Glycoconjugates with NeuAc-NeuAc-Gal-Glc are more effective at preventing adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells than glycoconjugates with NueAc-Gal-Glc. *Journal of Physiological Pharmacology*. 55, 607-625.

Hayakawa T y Hirai M. **2003**. An assay of ganglioside using fluorescence image analysis on a thin-layer chromatography plate. *Analytical Chemistry*. 75, 6728-6731.

Heine WE, Klein PD, Reeds PJ. **1991**. The importance of  $\alpha$ -lactalbumin in infant nutrition.

*The Journal of Nutrition*. 121, 277-283.

Hopper KE y McKeinze HA. **1973**. Minor components of bovine  $\alpha$ -lactalbumin A and B. *BBA - Protein Structure*. 295, 352-363.

Huang JQ, Trasler JM, Igdoura S, Michaud J, Hanal N, Gravel RA. **1997**. Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Human molecular genetics*. 6, 1879-1885

Idota T, Kawakami H, Murakami Y, Sugawara M. **1995**. Inhibition of cholera toxin by human milk fractions and sialyllactose. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 59, 417-419.

Ito M, Ikeda K, Suzuki Y, Tanaka K, Saito M. **2002**. An improved

fluorimetric high-performance liquid chromatography method for sialic acid determination: An internal standard method and its application to sialic acid analysis of human apolipoprotein E. *Analytical Biochemistry*. 300, 260-266.

IUPAC-IUB. **1997**. Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of glycolipids. *Glycoconjugate Journal*. 16, 1-6.

Ivleva VB, Elkin YN, Budnik BA, Moyer SC, O'Connor PB, Costello CE. **2004**. Coupling thin-layer chromatography with vibrational cooling matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry for the analysis of ganglioside mixtures. *Analytical Chemistry*. 76, 6484-6491.

Ivleva VB, Sapp LM, O'Connor PB, Costello CE. **2005**. Ganglioside analysis by thin-layer chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*. 16, 1552-1560.

Iwamori M, Takamizawa K, Momoeda M, Iwamori Y, Taketani Y. **2008**. Gangliosides in human, cow and goat milk, and their abilities as to neutralization of cholera toxin and botulinum type A neurotoxin. *Glycoconjugate Journal*. 25, 675-683.

Karamanos NK y Wikström B. **1990**. Determination of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acids in glycoconjugates by reversed phase high-performance liquid-chromatography with ultraviolet

detection. *Journal of Chromatography A*. 503, 421-429.

Karlsson KA, Stromberg N. **1987**. Overlay and solid-phase analysis of glycolipids receptors for bacteria and viruses. *Methods in enzymology*. 138, 220-232.

Karlsson KA, Lanne B, Pimlott W, Teneberg S. **1991**. The resolution into molecular species on desorption of glycolipids from TLC chromatograms, using combined TLC and fast-atom-bombardment MS. *Carbohydrates Research*. 221, 49-61.

Katalinic JP. **1994**. Analysis of glycoconjugates by fast atom bombardment mass spectrometry and related ms techniques. *Mass Spectrometry Reviews*. 13, 77-98.

Kawakami H, Ishiyama Y, Idota T. **1994**. Stability of milk gangliosides and formation of

GD<sub>3</sub> lactone under natural acidic conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 58, 1314-1315.

Kleint A, Diaz S, Ferreira I, Lamblin G, Roussel P, Manzi AE. **1997**. New sialic acids from biological sources identified by a comprehensive and sensitive approach: liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) of SIA quinoxalinones. *Glycobiology*. 7, 421-432.

Klenk E. **1941**. Neuraminsaeure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids. *Hoppe-Seyler's Z Physiological Chemistry*. 268, 50-58.

Kuhn R y Brossmer R. **1954**. Uber die Prosthetische Gruppe der Mucoproteine des Kuhcolostrums. *Chemische Berichte*. 87, 123-125.

Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobet. **2000**. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition*. 20, 699-722.

Lacomba R, Salcedo J, Alegría A, Lagarda MJ, Barbera R, Matencio E. **2010**. Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51, 346-357.

Ladisch S y Gillard B. **1985**. A solvent partition method for microscale ganglioside purification. *Analytical Biochemistry*. 146, 220-231.

Laegreid A, Otnaess ABK, Fuglesang J. **1986**. Human and bovine milk: comparison of ganglioside composition and

enterotoxin- inhibitory activity. *Pediatric Research*. 20, 416-421.

Lagana A, Marino A, Fago G, Martinez BP. **1993**. *Hydrolysis method using microwaves: Determination of N-acetyl- and N- glycolylneuraminic acids in biological systems by fluorometric high-performance liquid chromatography*. *Analytical Biochemistry*. 215, 266-272.

Lamari FN y Karamanos NK. **2002**. Separation methods for sialic acids and critical evaluation of their biologic relevance. *Journal of Chromatography B*. 781, 3-19.

Leeden RW, Yu RK. **1983**. Gangliosides: Structure, isolation, and analysis, *Methods of Enzymology*. 83, 139-191.

Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. **2006**. Sialic acid – specific lectins:

occurrence, specificity and functions. *Cellular and Molecular Life Science*. 63, 1331-1354.

Löfling J, Paton A, Varki N, Paton J, Varki A. **2009**. A dietary non-human sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome. *Kidney International*. 76, 140-144.

Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale M. **2006**. Identification of gangliosides GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> as receptors for BK virus. *Journal of Virology*. 80, 1361-1366.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **1951** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.

Mahaut M, Jeantet R, Brulee G, Schock P. **2004**. Productos lácteos

industriales. Ed Acribia, S.A., Zaragoza, 53-65.

Makatsori E, Karamanos NK, Anastassiou ED, Hjerpe A, Tsegenidis T. **1998**. A Method to Quantitate Total Sialic Acid, Glucosamine, and Galactosamine in Blood Serum and Glycoconjugates by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*. 21, 3031-3045.

Maldonado J, Gil M, Lara F. **2010**. Nutrición del lactante, en Gil A, Maldonado J, Martínez E (Eds.), Tratado de Nutrición (2ª Edición): Nutrición Humana en el Estado de Salud (Tomo III), Editorial Médica Panamericana, Madrid, 207- 226.

Malykh YN, Schauer R, Shaw L. **2001**. N-glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie*. 83, 623-634.

Martín MJ, Martín-Sosa S, García-Pardo LA, Hueso P. **2001**. Distribution of bovine milk sialoglycoconjugates during lactation. *Journal of Dairy Science*. 84, 995-1000.

Martín MJ, Vázquez E, Rueda R. **2007**. Application of a sensitive fluorometric HPLC assay to determine the sialic acid content of infant formulas. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 2943-2949.

Martin RM, Gunnell D, Davey G. **2005**. Breastfeeding in infancy and blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*. 161, 15–26.

Martínez O, Suárez MD. **2010**. Metabolismo de los hidratos de carbono, en Gil A., Sánchez F (Eds.), Tratado de Nutrición (2ª Edición): Bases fisiológicas y

bioquímicas de la nutrición (Tomol), Editorial Médica Panamericana, Madrid, 230- 231.

Martín-Sosa S, Martín MJ, García-Pardo LA, Hueso P. **2003**. Sialyloligosacarides in human and bovine milk and in infant formulas: variations with the progression of lactation. *Journal of Dairy Science*. 86, 52-59.

Martín-Sosa S, Martín MJ, García-Pardo LA, Hueso P. **2004**. Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation. *Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 39, 499-503.

Marzouk SAM, Ashraf SS, Al Tayyari K. **2007**. Prototype amperometric biosensor for sialic acid determination. *Analytical Chemistry*. 79, 1668-1674.

Matoo RL y Roseman S. **1997**. Quantitative determination of sialic acid in the monosialoganglioside, GM<sub>1</sub>, by the thiobarbituric acid method. *Analytical Biochemistry*. 246, 30-33.

Matsuno K y Suzuki S. **2008**. Simple fluorimetric method for quantification of sialic acids in glycoproteins. *Analytical Biochemistry*. 375, 53-59.

Mercasa. **2009**. Alimentación infantil. En: Alimentación en España 2009. [http://www.munimerca.es/mercasa/alimentacion\\_2009/3\\_info\\_sectores.html](http://www.munimerca.es/mercasa/alimentacion_2009/3_info_sectores.html)

Moore KM, Ettinger AC, Yokoyama MT. **2000**. Variation in ganglioside content of bovine dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 13, 783-790.

Morán J. **1990**. Lactancia materna en España. *Actas de Nutrición*. 4, 17-22.

Morán J. **1992**. Importancia de la lactosa en la absorción de calcio. *Pediatrka*. 12, 31-36.

Mosmann T. **1983**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*. 65, 55-63.

Muchmore EA, Díaz S, Varki A. **1998**. A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes. *American Journal of Physical Anthropology*. 107, 187-198.

Müthing J y Mühlradt PF. **1988**. Detection of gangliosides of the GM<sub>1b</sub> type on high-performance thin-layer chromatography plates by immunostaining after

neuraminidase treatment. *Analytical Biochemistry*. 173, 10-17.

Müthing J. **1996**. High-resolution thin-layer chromatography of gangliosides. *Journal of Chromatography A*. 720, 3-25.

Muraro A, Dreborg S, Halken S. **2003**. Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part III: critical review of published peer-reviewed observational and interventional studies and final recommendations. *Pediatric Allergy and Immunology*. 15, 291-307.

Nakata D y Troy FA. **2005**. Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine de DP of

polySia chains on N-CAMS. *Journal of Biological Chemistry*. 208, 38305-38316.

Narasimhan R y Murray RK. **1979**. Neutral glycosphingolipids and gangliosides of human lung and lung tumours. *Biochemistry Journal*. 179, 199-211.

Narasinga BS y Prabhavathi T. **1978**. An in vitro method for predicting the bioavailability of iron from foods. *American Journal of Clinical Nutrition*. 31, 169-175.

Narbona E, Sierra P, Contreras F. **2005**. Nutrición del recién nacido a término, en: Gil A, Camarero E, Culebras JM, González J, León M (Eds.), *Tratado de Nutrición: Nutrición Humana en el Estado de Salud (TomoIII)*, Grupo Acción Médica, Barcelona, 253- 272.

Neeser JR, Golliard M, Del Vedovo S. **1991**. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. *Journal of Dairy Science*. 74, 2860-2871.

Newburg DS. **1999**. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Current Medical Chemistry*. 6, 117-127.

Nimmerjahn F, Anthony RM, Ravetch JV. **2007**. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vitro activity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 104, 8433-8437.

Nohle U y Schauer R. **1981**. Uptake, metabolism and excretion of orally and intravenously administered, <sup>14</sup>C- and <sup>3</sup>H-labeled *N*-acetylneuraminic acid mixture in the mouse and rat.

*Hoppe Seylers Z. Physiological Chemistry*. 362, 1495–506.

Nohle U, Beau JM, Schauer R. **1982**. Uptake, metabolism and excretion of orally and intravenously administered, double-labeled *N*-glycoloylneuraminic acid and single-labeled 2-deoxy-2,3-dehydro-Nacetylneuraminic acid in mouse and rat. *European Journal of Biochemistry*. 126, 543–48.

Nohle U y Schauer R. **1984**. Metabolism of sialic acids from exogenously administered sialyllactose and mucin in mouse and rat. *Hoppe Seylers Z. Physiological Chemistry*. 365:1457–67.

O'Connor PB, Costello CE, Mirgorodskaya E. **2001**. High pressure matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier

transform mass spectrometry ion source for thermal stabilization of labile biomolecules. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 15, 1862-1868.

O'Connor PB, Mirgorodskaya E, Costello CE. **2002**. High pressure matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry for minimization of ganglioside fragmentation. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*. 13, 402-407.

Ong E, Nakayama J, Angata K, Reyes L, Katsuyama T. **1998**. Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology*. 8, 415-424

Organización Mundial de la Salud (OMS). **2001**. Infant and young child nutrition: Global strategy for

infant and young child feeding. Executive Board 109th Session provisional agenda item 3.8 (EB109/12).

Organización Mundial de la Salud (OMS). **2006**. Child growth standards. Weight-for-age. Charts of Z-scores of boys and girls. [http://www.who.int/childgrowth/standards/weight\\_for\\_age/en/index.html](http://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_age/en/index.html).

Organización Mundial de la Salud (OMS). Horta BL, Bahl R, Martines JC, Victora CG. **2007**. Evidence on the Long-Term Effects of Breastfeeding. Systematic Reviews and Meta-analyses. *WHO Press*, Geneva, Switzerland.

Ortaldo JR, Mason AT, Longo DL, Beckwith M, Creekmore SP, McVicar DW. **1996**. T cell activation via the disialoganglioside GD3: analysis

of signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*. 60, 533-539.

Ortner K y Buchberger W. **2008**. Determination of sialic acids released from glycoproteins using capillary zone electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *Electrophoresis*. 29, 2233-2237.

Oumesmar BN, Vignais L, Duhamel-Clerin E, Avellana-Adalid V, Rougon G, Baron-Van Evercooren A. **1995**. Expression of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. 7, 480-491.

Owen CG, Whincup PH, Gilg JA. **2003**. Effect of breast feeding in infancy on blood pressure in later life: systematic review and meta-

analysis. *British Medical Journal*. 327, 1189-1195.

Owen CG, Martin RM, Whincup PH. **2006**. Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*. 84, 1043-1054.

Owen CG, Whincup PH, Kaye SJ. **2008**. Does initial breastfeeding lead to lower blood cholesterol in adult life? A quantitative review of the evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*. 88, 305-314.

Pagano RE. **1990**. Lipid traffic in eukaryotic cells: mechanisms for intracellular transport and organelle-specific enrichment of lipids. *Current Opinion in Cell Biology*. 2, 652-663.

Pahlsson P y Nilsson B. **1988**. Fast atom bombardment-mass

spectrometry of glycosphingolipids extracted from thin-layer chromatography plates. *Analytical Biochemistry*. 168, 115-120.

Pan XL e Izumi T. **2000**. Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk and infant formulas. *Early Human Development*. 57, 25-31.

Park EJ, Suh M, Ramanujam K, Steiner K, Begg D, Clandinin MT. **2005a**. Diet-induced changes in membrane gangliosides in rat intestinal mucosa, plasma and brain. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 40, 487-495.

Park EJ, Suh M, Thomson B, Thomson ABR, Ramanujam KS, Clandinin MT. **2005b**. Dietary ganglioside decreases cholesterol content, caveolin expression and

inflammatory mediators in rat intestinal microdomains. *Glycobiology*. 15, 935-942.

Park EJ, Suh M, Clandinin MT. **2005c**. Dietary ganglioside and long-chain polyunsaturated fatty acids increase ganglioside GD3 content and alter the phospholipid profile in neonatal rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 46, 2571-2575.

Pascuzzo C. **2008**. Farmacología básica: Farmacología en grupos especiales de población. 104-111. Disponible on-line: [http://bibmed.ucla.edu.ve/edocs\\_bmucla/MaterialDidactico/farmacologia/farmbasica.pdf](http://bibmed.ucla.edu.ve/edocs_bmucla/MaterialDidactico/farmacologia/farmbasica.pdf)

Pérez-Aguilar R, Genta S, Sánchez S. **2008**. Renal gangliosides are involved in lead intoxication. *Journal of Applied Toxicology*. 28, 122-131.

Petrovic M, Macan MK, Ivankovic D, Matecic S. **2000**. Video-densitometric quantitation of fluorescence quenching on totally irradiated thin-layer chromatographic plates. *Journal of AOAC International*. 83, 1457-1462.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. **1983**. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*. 47, 323-330.

Piper DW y Fenton BH. **1965**. pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut*. 6, 506-508.

Pöртner A, Peter-Katalinic J, Brade H, Unland F, Büntemeyer H, Müthing J. **1993**. Structural characterization of gangliosides

from resting and endotoxin-stimulated murine B lymphocytes. *Biochemistry*. 32, 12685-12693.

Puente R, García-Pardo LA, Hueso P. **1992**. Gangliosides in bovine milk. Changes in content and distribution of individual levels during lactation. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 373, 283-288.

Puente R, García-Pardo A, Rueda R, Gil A, Hueso P. **1994**. Changes in ganglioside and sialic acid contents of goat milk during lactation. *Journal of Dairy Science*. 77, 39-44.

Puente R, García-Pardo A, Rueda R, Gil A, Hueso P. **1995**. Ewe's milk: changes in the contents of gangliosides and sialic acid during. *Journal of Dairy Research*. 62, 651-654.

Puente R, García-Pardo A, Rueda R, Gil A, Hueso P. **1996**. Seasonal variations in the concentration of gangliosides and sialic acids in milk from different mammalian species. *International Dairy Journal*. 6, 315-322.

Quigley MA, Cumberland P, Cowden JM. **2006**. How protective is breastfeeding against diarrhoeal disease in 1990s England? A casecontrol study. *Archives of Disease in Childhood*. 91, 245-250.

Rahmann H. **1995**. Brain gangliosides and memory formation. *Behavioural Brain Research*. 66, 105-116.

Rahmann H y Jonas U. **1998**. Gangliosides in thermal adaptation: towards a physicochemical model of ganglioside function. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 10, 421-437.

Rauvala H. **1976**. Gangliosides of human kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 251, 7517-7520.

Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. *Boletín Oficial del Estado*. 131, 25121-25137.

Reglamento (CE) nº 109/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de enero, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 39, 14-15.

Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre, relativo a las

declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 404, 9-25.

Reglero A, Bravo IG, Fernandez-Martínez V. **2007**. Ácidos siálicos: distribución, metabolismo y función biológica. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 73, 833-871.

Reuter G, Pfeil R, Stoll S, Schauer R, Kamerling JP, Versluis C, Vliegthart JF. **1983**. Identification of new sialic acids derived from glycoprotein of bovine submandibular gland. *European Journal of Biochemistry*. 134, 139-143.

Rohrer JS. **2002**. Analyzing sialic acids using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*. 283, 3-9.

Roig MJ. **1997**. Tesis Doctoral: Biodisponibilidad de cobre y calcio en leche y fórmulas para lactantes. Valencia.

Ros G. **2009**. Alimentos infantiles para el periodo lácteo (parte I). *Alimentación, Nutrición y Salud*. 16, 1-15.

Rueda R, Tabsh K, Ladisch S. **1993**. Detection of complex gangliosides in human amniotic fluid. *FEBS Letters*. 328, 13-16.

Rueda R, Sabatel JL, Maldonado J, Molina-Font JA, Gil A. **1998**. Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies levels of fecal microflora in preterm newborn infants. *Journal of Paediatrics*. 133, 90-94.

Rueda R, Gómez-León C, Gil A. **2002**. Ribonucleica cid hydrolysis by intestinal explants of neonatal piglets. *Journal of Pediatric*

*Gastroenterology and Nutrition*. 35, 685-690.

Sánchez C, Cubero J, Sánchez J, Chanclón B, Rivero M, Rodríguez A, Barriga C. **2009**. The possible role of human milk nucleotides as sleep inducers. *Nutritional Neuroscience*. 12, 2-8.

Sánchez-Díaz A, Ruano MJ, Lorente F, Hueso P. **1997**. A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant formulas. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 24, 405-410.

Sánchez-Juanes F, Alonso JM, Zancada L, Hueso P. **2009**. Glycosphingolipids from bovine milk and milk fat globule membranes: a comparative studies. Adhesion to enterotoxigenic *Escherichia coli*

strains. *Biological Chemistry*. 390, 31-40.

Saqr HE, Pearl DK, Yates AJ. **1993**. A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes. *Journal of Neurochemistry*. 61, 395-411.

Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. **2007**. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*. 101, 492-501.

Schauer R y Corfield AP. **1982**. Sialic acids in: R. Schauer (ed.), Sialic acids, Chemistry, Metabolism and Function. Springer-Verlang, Wien, NewYork, 51-57.

Schauer R. **2004**. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology*. 107, 49-64.

Schawrzmann G. **2001**. Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells. *Cell and Developmental Biology*. 12, 163-171.

Schlemmer U. **1995**. Bioavailability of nutrients. Conceptual aspects of definition and problems of determination. *British Journal Nutrition*. 73, 150-151.

Schnaar RL. **2000**. Glycobiology of the nervous system, in: Ernst B, Hart GW, Sinaÿ P (Eds), *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part II: Biology of Saccharides*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1013–1027.

Schnabl KL, Field C, Clandinin MT. **2009a**. Ganglioside composition of differentiated Caco-2 cells resembles human colostrum and neonatal rat intestine. *British Journal of Nutrition*. 101, 694-700.

Schnabl KL, Larcelet M, Thomson ABR, Clandinin MT. **2009b**. Uptake and fate of ganglioside GD3 in human intestinal Caco-2 cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 297, 52-59.

Schröder C, Nöhle U, Shukula AK, Schauer R. **1983**. Improved methods for the isolation and structural analysis of trace amounts of new sialic acids – identification of N-glycolylneuraminic acid in man. *Glycoconjugates, Proceedings of the 7<sup>th</sup> international symposium on glycoconjugates, Lund-Roneby, 17-23 July*. 162-163.

Seliwanoff T. **1887**. Notiz über eine Fruchtzuckerreaction. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 20, 181–182.

Séverin S y Wenshui X. **2005**. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*. 45, 645-656.

Shaw CJ, Chao H, Xiao B. **2001**. Determination of sialic acid by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 913, 365-370.

Silvestre MD. **1998**. Tesis Doctoral: Estudio longitudinal de las concentraciones de cobre, hierro y cinc en leche de mujer. Valencia.

Siskos PA y Spyridiaki MHE. **1999**. Determination of sialic acids in biological fluids using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B*. 724, 205-212.

Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. **2006**. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*. 17, 1R-13R.

Sorensen LK. **2006**. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the determination of gangliosides GD<sub>3</sub> and GM<sub>3</sub> in bovine milk and infant formulae. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 20, 3625-3633.

Spichtig V, Michaud J, Austin S. **2010**. Determination of sialic acids in milks and milk-based products. *Analytical Biochemistry*. 405, 28-40.

Spyridiaki MHE y Siskos PA. **1999**. Development of a new direct reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the separation and determination of

sialic acids. *Journal of Chromatography A*. 831, 179-189.

Sugahara K, Sugimoto K, Nomura O, Usui T. **1980**. Enzymatic assay of serum sialic acid. *Clinical Chimica Acta*. 108, 493-498.

Suzuki K. **1965**. The pattern of mammalian brain gangliosides-II. *Journal of Neurochemistry*. 12, 629-638.

Svennerholm L. **1956**. The quantitative estimation of cerebroside in nervous tissue. *Journal of Neurochemistry*. 1, 42-53.

Svennerholm L. **1957**. Quantitative estimation of sialic acids, II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochimica et Biophysica Acta*. 24, 604-611.

Svennerholm L. **1958**. Quantitative estimation of sialic acids III. An anion exchange resin method. *Acta Chemica Scandynavica*. 12, 547-554.

Svennerholm, L. **1963**. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *Journal of Neurochemistry*. 10, 613-623.

Svennerholm L y Fredman P. **1980**. A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 617, 97-109.

Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Mansson JE, Rosengren B, Rynmark BM. **1989**. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1005, 109-117.

Takamizawa K, Iwamori M, Mutai M, Nagai Y. **1986**.

Selective changes in gangliosides of human milk during lactation: a molecular indication for the period of lactation. *Biochimica et Biophysica Acta- Lipids and Metabolism*. 879, 73-77.

Tang KT, Liang LN, Cai YQ, Mou SF. **2008**. Determination of sialic acid in milk and products using high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 36, 1535-1538.

Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Díaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. **2003**. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proceeding of the Nutritional Academy of Science USA*. 100, 12045-12050.

Tettamanti G, Bonali F, Marchesini S, Zambotti V. **1973**. A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 296, 160-170.

Tettamanti G. **2004**. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconjugates Journal*. 20, 301-317.

Tram TH, Brand-Miller JC, McNeil Y, McVeagh P. **1997**. Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with formula fed infants. *Archives of Disease in Childhood*. 77, 315-318.

TRIGR Study Group. **2008**. Study design of the trial to reduce IDDM in genetically at risk (TRIGR). *Pediatric Diabetes*. 8, 117-137.

Tzanakakis GN, Syrokou A, Kanakis I, Karamanos N. **2006**. Determination and distribution of N-Acetyl- and N-Glycolylneuraminic acids in culture media and cell-associated glycoconjugates from human malignant mesothelioma and adenocarcinoma cells. *Biomedical Chromatography*. 20, 434-439.

Uauy R, Quan R, Gil A. **1994**. Role of nucleotides in intestinal development and repair: Implications for infant nutrition. *Journal of Nutrition* 124, 1436S-1441S.

Uemura Y, Asakuma S, Yon L, Saito T, Fukuda K, Arai I, Urashima T. **2006**. Structural determination of the oligosaccharides in the milk of an Asian elephant (*Elephas maximus*). *Comparative*

*Biochemistry and Physiology, Part A*. 145, 468–478.

Useh NM, Olaniyan OA, Nok AJ. **2008**. Comparative analysis of sialic acid levels in the colostrums and milk of ruminants: possible role in the passive immunity against neonatal infections. *International journal of Dairy Technology*. 61, 253-255.

Usuki S, Taguchi K, Cawthraw A, Shibata K, Ariga T, Newell DG, Yu RK. **2006**. Human and chicken antibodies to gangliosides following infection by *Campylobacter jejuni*. *Experimental Neurology*. 200, 50-55.

Valianpour F, Abeling N, Duran M, Huijmans J, Kulik W. **2004**. Quantification of free sialic acid in urine by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry: A tool for the diagnosis of sialic acid

storage disease. *Clinical Chemistry*. 50, 403-409.

Van Campen DR y Glahn RP. **1999**. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. *Field Crops Research*. 60, 93-113.

Van der Ham M, Prinsen BH, Huijmans JG, Abeling NG, Dorland B, Berger R, deKoning T, Velden M. **2007**. Quantification of free and total sialic acid excretion by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 848, 251-257.

Vanier MT, Holm M, Ohman R, Svennerholm L. **1971**. Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 18, 581-592.

Varki A. **1993**. Biological roles of oligosaccharides: all of the

theories are correct. *Glycobiology*. 3, 97-130.

Varki A. **1999**. Sialic acids, in: Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, CSHL Press, New York. 25-40.

Varki A. **2001**. N-glycolyneuraminic acid deficiency in humans. *Biochimie*. 83, 615-622.

Varki NM y Varki A. **2007**. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory Investigation*. 87, 851-857.

Varki A. **2008**. Sialic acids in human health and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 14, 351-360.

Varki A y Schauer R. **2009**. Sialic acids, in: Varki A, Cummings

RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (Eds). Essentials of Glycobiology, 2nd edition, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 35-52.

Vázquez AM, Alfonso M, Lanne B, Karlsson KA, Carr A, Barroso O, Fernández LE, Rengifo E, Lanio ME, Álvarez C. **1995**. Generation of a murine monoclonal antibody specific for *N*-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma*. 14, 551-556.

Vesper H, Schmelz EV, Nikolova-Karakashian MN, Dillehay DL, Lynch DV, Merrill Jr AH. **1999**. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *The Journal of Nutrition*. 129, 1239-1250.

Vias A y Schnaar R. **2001**. Brain gangliosides: functional ligands for myelin stability and control of nerve regeneration. *Biochimie*. 83, 677-682.

Walker A. **2010**. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *Journal of Pediatrics*. 156, S3-S7.

Wang B, Brand-Miller J, McNeil Y, McVeagh P. **1998**. Sialic acid concentration of brain gangliosides: variation among eight mammalian species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119, 435-439.

Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P. **2001**. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition*. 74, 510-515.

Wang B y Brand-Miller J. **2003**. The role and potential of sialic acid in

human *nutrition*, *European Journal of Clinical Nutrition*. 57, 1351-1369.

Wang B, Downing JA, Petocz P, Brand-Miller J, Bryden WL. **2007**. Metabolic fate of intravenously administered *N*-acetylneuraminic acid-<sup>6-14</sup>C in newborn piglets. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 16:110–15.

Wang B. **2009**. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annual Review of Nutrition*. 29, 177-222.

Warren L. **1959**. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *Journal of Biological Chemistry*. 234, 1971-1975.

Wennekes T, van den Berg RJ, Boot RG, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JMFG. **2009**. Glycosphingolipids-Nature,

function and pharmacological modulation. *Angewandte Chemie International Edition*. 48, 8848-8869.

Wienk KJH, Marx JJM, Beynen AC. **1999**. The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*. 38, 51-75.

Williams MA y McCluer RH. **1980**. The use of Sep-Pack C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *Journal of Neurochemistry*. 35, 266-269.

Willison HJ. **2007**. Gangliosides as targets for autoimmune injury to the nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 103, 143-149.

WO 2008/005032. **2008**. Enriched Infant Formulas. World Intellectual Property Organization.

Yin J, Hashimoto A, Izawa M, Miyazaki K, Chen GY,

Takematsu H, Kozutsumi Y, Suzuki A, Furuhata K, Cheng FL, Lin CH, Sato C, Kitajima K, Kannagi R. **2006**. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Research*. 66, 2937-2945.

Yoshino H, Ariga T, Latov N, Miyatake T, Kushi Y, Kasama T, Handa S, Yu RK. **1993**. Fucosyl-GM<sub>1</sub> in human sensory nervous tissue is a target antigen in patients with autoimmune neuropathies. *Journal of Neurochemistry*. 61, 658-663.

Yu RK y Ledeen RW. **1972**. Gangliosides of human, bovine, and rabbit plasma. *Journal of Lipid Research*. 13, 680-686.

Yuasa H, Scheinberg DA, Houghton AN. **1990**. Gangliosides of T lymphocytes:

evidence for a role in T-cell activation. *Tissue Antigens*. 36, 47-56.

Zancada L. **2008**. Tesis doctoral: Estudio del contenido de oligosacáridos, glicolípidos y fosfolípidos de la leche de oveja. Participación en la defensa del recién nacido frente a infecciones. Salamanca.

Zanetta JP, Pons A, Wersen IA, Mariller C, Leroy Y, Timmerman P, Schauer R. **2001**. Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiology*, 11, 663-676.

Zhang G, Lopez PHH, Li CY, Mehta NR, Griffin JW, Schnaar RL, Sheikh KA. **2004**. Anti-ganglioside antibody-mediated neuronal cytotoxicity and its protection by intravenous

immunoglobulin: implications for immune neuropathies. *Brain*. 127, 1085-1100.

Zilliken F, Braun, GA, Gyorgy P. **1955**. Gynaminic acid. A naturally occurring from a neuraminic acid in human milk.

*Archives of Biochemistry. Biophysics*. 54, 567-570.

Zubay G y Strominger J. **1988**. Sialic acids, in: Zubay G (Ed.) *Biochemistry*, McMillan Pub., NewYork, 131-15.

**ANEXOS**

**ANEXO I - Composición de los preparados para lactantes y de continuación (RD 867/2008, ESPGHAN 1990 y 2005).**

		RD 867/2008		ESPGHAN (1990)
		PL	PC	PC
<b>Energía (kcal/100ml)</b>		60-70 <sup>a</sup>	60-70	60-80
<b>Proteínas (g/kcal)</b>	Leche vaca	1,8-3,0 <sup>a</sup>	1,8-3,5	3-4,5
	Hidrolizados	1,8-3,0 <sup>a</sup>	2,25-3,50	--
	Soja con o sin leche vaca	2,25-3,0 <sup>a</sup>	2,25-3,5	--
<b>Aminoácidos (mg/100kcal)</b>	Taurina	12 (máx.) <sup>a</sup>	12 (máx.)	--
	Colina	7-50 <sup>a</sup>	--	--
<b>Grasa (g/kcal)</b>		4,4-6,0 <sup>a</sup>	4,0-6,0	4-6
	Laurico y mirístico (% ctmg)	20 (máx.) <sup>a</sup>	20 (máx.)	--
	Trans (% ctmg)	3 (máx.) <sup>a</sup>	3 (máx.)	--
	Linoléico (mg/100kcal)	300-1200 <sup>a</sup>	300-1200	500-1200
	$\alpha$ -linolénico (mg/100kcal)	50 (mín.) <sup>a</sup>	50 (mín.)	--
	Linoleico : $\alpha$ - linolénico	5-15 <sup>a</sup>	5-15	--
	PCL n-3 (% ctmg)	1	1	--
	PCL n-6 (% ctmg)	2	2	--
	Fosfolípidos (g/l)	2 <sup>a</sup>	2	--

		RD 867/2008		ESPGHAN (1990)
		PL	PC	PC
<b>Hidratos de carbono</b> <b>(g/100kcal)</b>		9-14 <sup>a</sup>	9-14	8-12
	Lactosa (g/100kcal)	4,5 (mín.)	4,5 (mín.)	--
	Fructo y galacto oligosacáridos (g/100ml)	0,8 (máx)	0,8 (máx.)	--
<b>Minerales</b> <b>(mg/100kcal)</b>	Sodio	20-60 <sup>a</sup>	20-60	--
	Potasio	60-160 <sup>a</sup>	60-160	--
	Cloro	50-160 <sup>a</sup>	50-160	--
	Calcio	50-140 <sup>a</sup>	50-140	--
	Fósforo*	25-90 <sup>a</sup>	25-90	--
	Magnesio	5-15 <sup>a</sup>	5-15	--
	Hierro*	0,3-1,3 <sup>a</sup>	0,6-2	1-1,7
	Zinc	0,5-1,5 <sup>a</sup>	0,5-1,5	--
<b>Minerales</b> <b>(µg/100kcal)</b>	Cobre	35-100	35-100	80
	Yodo	10-50 <sup>a</sup>	10-50	--
	Selenio	1-9	1-9	--
	Manganeso	1-100	1-100	50
	Flúor	100 (máx.)	100 (máx.)	60

		RD 867/2008		ESPGHAN (1990)
		PL	PC	PC
<b>Vitaminas</b>  (µg/100Kcal)	Vitamina A (ER)	60-180 <sup>a</sup>	60-180	--
	Vitamina D	1-2,5 <sup>a</sup>	1-3	--
	Tiamina	60-300 <sup>a</sup>	60-300	--
	Riboflavina	80-400 <sup>a</sup>	80-400	--
	Niacina	300-1500 <sup>a</sup>	300-1500	--
	Ácido pantoténico	400-2000 <sup>a</sup>	400-2000	--
	Vitamina B6	35-175 <sup>a</sup>	35-175	--
	Biotina	1,5-7,5 <sup>a</sup>	1,5-7,5	--
	Ácido fólico	10-50 <sup>a</sup>	10-50	--
	Vitamina B12	0,1-0,5 <sup>a</sup>	0,1-0,5	--
	Vitamina C (mg/100Kcal)	10-30 <sup>a</sup>	10-30	--
	Vitamina K	4-25 <sup>a</sup>	4-25	--
	Vitamina E (mg ET)	0,5-5 <sup>a</sup>	0,5-5	--

<sup>a</sup>Valores recomendados por la ESPGHAN (2005).

\* Los preparados a partir hidrolizado de soja, con o sin leche de vaca, establecen los siguientes valores (mg/100Kcal): PL fósforo 30-100, hierro 0,45-2 y PC fósforo 30-100, hierro 0,9-2,5.

Ctmg, contenido total en materia grasa; ER, equivalente de todo trans retinol; ET, equivalente de D-tocoferol; PCL, poliinsaturados de cadena larga.

## ANEXO II – Reactivos

Todos los reactivos son de grado analítico, excepto los indicados específicamente.

- 1,2-diamino-4,5-metilendioxi benceno dihidrocloruro (Sigma)
- 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil bromo de tetrazolio (Sigma)
- 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (Sigma)
- Acetato de tertbutilo (Sigma)
- Acetato sódico (Fluka)
- Acetona (Merck)
- Acetonitrilo para HPLC (J.T. Baker)
- Ácido acético glacial (Merck)
- Ácido clorhídrico fumante (Merck)
- Ácido etilendiamíntetracético (Sigma)
- Ácido fórmico (Merck)
- Ácido N-acetilneruramínico (Sigma)
- Ácido N-glicolilneuramínico (Sigma)
- Ácido sulfúrico (Merck)
- Agua (desionizada, Milli-Q)
- Albúmina bovina fetal (Sigma)
- Alcohol *N*-amílico (Merck)
- Aminoácidos no esenciales (Gibco)
- Amoniac (Merck)
- Antibióticos (Gibco)
- Anti-GD<sub>3</sub> - ficoeritrina (Santa Cruz BioTech)
- Anti-GM<sub>1</sub> (CIM La Habana)
- Anti-GM<sub>3</sub> (Seikagaku)
- Anti-Ig biotinilado de conejo (Sigma)
- Anti-Neu5Gc (EuropaBioproducts)
- Butanol (Sigma)
- Cloroformo (Merck, J.T. Baker)
- Cloruro cálcico (Panreac)
- Cloruro potásico (Panreac)
- Cloruro sódico (Panreac)
- Dihidrogeno fosfato sódico (Merck)
- Disolución azul tripán (Sigma)

- Disolución tripsina-EDTA (2,5%, p/v) (Gibco)
- Estreptavidina-fosfatasa alcalina (Sigma)
- Extracto porcino biliar (Sigma)
- Ficoeritrina (Sigma)
- Formiato sódico (Fluka)
- Fungizona (Gibco)
- GD<sub>3</sub> 100% (Matreya)
- GM<sub>3</sub> 98% (HyTest)
- HEPES (Gibco)
- Hexano (Merck)
- Hidrogeno carbonato sódico (Merck)
- Hidrogeno fosfato sódico (Merck)
- Hidrosulfito sódico (Sigma)
- Hidróxido sódico (Merck)
- Isopropanol ácido (Sigma)
- Isotiocianato de fluoresceína (Sigma)
- L-Glutamina (Gibco)
- Lowry A y B (Sigma)
- Medio mínimo esencial Dubelco (Gibco)
- Metanol para análisis y HPLC (Merck, J.T. Baker)
- β-Mercaptoetanol (Fluka)
- Orcinol (Panreac)
- Pancreatina porcina (Sigma)
- Patrón gangliósidos cerebro bovino (cortesía Dr. Hueso)
- Pepsina porcina (Sigma)
- Phospray (Supelco)
- Piruvato sódico (Gibco)
- Poli-isobutilisometacrilato (Sigma)
- Reactivo Foli-Ciocalteu (Sigma)
- Resorcinol (Sigma)
- Sulfato de cobre (Merck)
- Tritón (Fluka)
- Trizma Base (Sigma)

### **ANEXO III – Disoluciones**

- Disolución de pepsina: 0,125 g de pepsina se disuelven en 10 ml de HCl 0,1 M (85 mL a 100 mL con agua desionizada).
- Disolución de pancreatina – extracto biliar: 0,05 g de pancreatina, 0,312 g de extracto biliar se disuelven en 12,5 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (0,84 g a 100 mL con agua desionizada).
- Disolución MTT: 50 mg se llevan a 100 mL con tampón PBS.
- Medio mínimo esencial de cultivo celular adicionado: DMEM (4,5 g de glucosa/L) con 10% BSA, 1% aminoácidos no esenciales, 1% antibióticos, 1% L-glutamina, 1% HEPES, 0,4% fungizona (todos los % en v/v).
- Reactivo derivatizante (DMB): 90 µL DMB 44,42 mM (10 mg a 1mL), 43 µL de ácido acético glacial, 50 µL de hidrosulfito sódico 140 mM (30 g a 1 mL), 28 µL de β-mercaptoetanol y 289 µL de agua Milli-Q.
- Reactivo de orcinol: 50 mg de orcinol, 39,5 mL de agua desionizada y 10 mL de ácido sulfúrico.
- Reactivo de resorcinol: 10 mL de disolución de resorcinol 2% (2g a 100mL), 80 mL de ácido clorhídrico fumante y 0,25 mL de sulfato de cobre 0,1M (24,7 g a 1L con agua desionizada) se llevan a 100 mL con agua desionizada.
- Tampón PBS: 8,5 g de cloruro sódico, 1,34 g de hidrogenofosfato sódico y 0,34 g de dihidrogenofosfato sódico se lleva a 1 L con agua desionizada.

## ANEXO IV – Material

- Cámara de recuento celular Neubauer (Bad Mergentheim)
- Cartuchos para extracción en fase sólida C-18 Sep-Pack (Waters)
- Columna cromatográfica Hidrosorb RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m) y precolumna Hidrosorb RP-18 (5 $\mu$ m) (Merck)
- Columna de vidrio con fritta cerámica (20 cm,  $\phi$  0,8 cm) (Biorad)
- Cubeta de desarrollo para TLC (5 x 10,5 x 11,5 cm) (Afora)
- Cubetas espectrofotométricas desechables semi-micro (Levantina)
- Frascos estériles para cultivos celulares de 75 y 150 mL (Corning)
- Filtros con fritta cerámica ( $\phi$  5 cm) (Scharlab)
- Filtros de membrana de 0,2  $\mu$ m (Millipore)
- Material de plástico y vidrio de uso común en el laboratorio (Levantina, Afora, Scharlab)
- Membrana de diálisis 3500 MWCO, 45 mm anchura, 29 mm  $\phi$  (SpectraPor)
- Microcon Ultracel YM-10 (Millipore)
- Placas HPTLC silica gel 60 con base de aluminio de 20 x 20 cm (Merck)
- Placas HPTLC silica gel 60 con base de vidrio de 10 x 10 cm y 10 x 10 cm premarcadas 5 x 5 cm (Merck)
- Placas de 24 pocillos con un área de 2,01 cm<sup>2</sup>/pocillo (Corning)
- Placas para microscopía de 8 pocillos con un área de 0,8 cm<sup>2</sup>/pocillo (Nunc)
- Resina DEAE-Sephadex, 40-125  $\mu$ m lecho seco (Sigma)
- Resina Dowex 1x8 – 400 mesh (Fluka)
- Resina Dowex Marathon A2 (Sigma)

- Revelador para TLC (Camag)

## **ANEXO V – Instrumentación**

- Agitador de tubos vórtex, WhirliMixer (Fison Scientific)
- Agitador magnético de 9 zonas, Multimatic N9 (P-Selecta)
- Balanza de precisión, HA-180M (AND)
- Baño – agitador, SB530 (Stuart)
- Báscula, 572 (Kern)
- Bloque calefactor, Stuart Scientific (Bibby)
- Cabina flujo laminar, BioIIA (Telstar)
- Cámara refrigerada (R. Masip-Ingeniero)
- Centrífuga, 3K15 (Sigma)
- Centrífuga, 5810R (Eppendorf)
- Centrífuga, GT422 (Jouan)
- Congelador -20°C, Confort (Lieber)
- Congelador -85°C, UN-6512E (Nuoire)
- Densitómetro, CS-9000 (Shimadzu)
- Equipo generación agua desionizada, Elix 3-UV (Millipore)
- Equipo generación agua Milli-Q, Plus (Millipore)
- Espectrofotómetro, Lamba 2 (Perkin Elmer)
- Espectrofotómetro de masas, Bruker Esquire 3000 plus (Bruker)
- Estufa de atmósfera controlada (Thermo)
- Evaporador de nitrógeno (Afora)
- Liofilizador, CT4 (EtoSic)
- Microscopio confocal, TCS SP (Leica)
- Microscopio invertido, CK2 (Olympus)

- pHmetro, GLP-21 (Crison)
  - Placa calefactora, TLC plate heater III (Camag)
  - Polytron, PT2000 (Kinematica)
  - Sistema HPLC Waters: controlador 600, bomba 600, desgasificador, automuestreador 771 plus, detector fluorescencia 747, colector de fracciones
- II. Estufa columna (Jones)
- Sistema rotavapor: rotavapor, R200 y baño, B480 (Büchi); bomba, M7-2C (Vacuumbrand); sistema recirculación de refrigerante, F12 (Julabo)