



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

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”**

LORENA ZANCADA VALDERRAMA

Salamanca, 2008



PABLO HUESO PÉREZ, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca,

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “Estudio del contenido de oligosacáridos, glicolípidos y fosfolípidos de la leche de oveja. Participación en la defensa del recién nacido frente a infecciones”, que ha sido realizada bajo su dirección por la licenciada en Bioquímica Dña. Lorena Zancada Valderrama en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el presente documento en Salamanca, a cinco de Noviembre de dos mil ocho.

Pablo Hueso Pérez

Este trabajo ha sido financiado mediante los siguientes proyectos de investigación:

- SA 019-04 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación de la Junta de Castilla y León titulado “Estudio de la adhesión de diversos sialoglicoconjugados de los lactorreemplazantes a cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* aisladas de bovinos. Contenido en sialoglicoconjugados de la leche de cabra y oveja”.

- SA053A07 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación de la Junta de Castilla y León titulado “Glicolípidos y fosfolípidos de la leche de cabra y oveja. Estudio de la capacidad de adhesión de estos compuestos a microorganismos patógenos (cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*) para neonatos de rumiantes”.

La autora de este trabajo ha disfrutado de una beca de formación de personal investigador de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Orden de 14 de Noviembre de 2003).

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría concluir este trabajo expresando mi agradecimiento a las personas que han contribuido a su desarrollo de una u otra manera:

Quiero agradecer a Ángel García Arroyo, veterinario de la Sociedad Cooperativa Ganadera de Lácteos y Derivados de Valdeverde (Salamanca), que nos proporcionó las muestras de leche de oveja.

Al Matadero Comarcal ASOCARSA S.A. (Salamanca) por facilitarnos la recogida de las muestras de sangre de ovino y al Dr. José Luis Vega Pla, del Laboratorio de Grupos Sanguíneos del Servicio de Cría Caballar (Córdoba) por enviarnos la sangre de caballo.

Al Dr. César Raposo, del Servicio General de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca, por las facilidades a la hora de hacer los análisis de ácidos grasos.

Al Dr. Clemens Kunz, del Instituto de Ciencias Nutricionales de la Universidad de Giessen (Alemania), por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio durante unos meses y por su trato amable.

A mis compañeros de laboratorio: a Ángel y a Fedra, porque ha sido un placer compartir un tiempo con vosotros, y a Fernando, por los momentos tan agradables que hemos compartido a lo largo de estos años, te echaré de menos. A los tres, gracias por vuestro compañerismo y vuestra amistad.

A mis compañeros de Departamento, en especial a los del 106, 108 y 112. A los profesores y miembros del Departamento, por su trato cordial y su disposición para prestarme ayuda cuando fue necesaria. A Josefa por ayudarme y resolver mis dudas siempre que lo necesité.

A mis amigos, en especial a Bea y a Móni, que han estado a mi lado a lo largo de estos años, compartiendo los buenos y los malos momentos. Gracias por estar siempre allí.

De una forma especial quiero dar las gracias a Pablo. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias por ser tan buen jefe (será difícil encontrar otro igual), y sobre todo gracias por tu cercanía y tu amabilidad.

A mi familia, mi abuela, mi hermano, y sobre todo a mis padres, porque a ellos les debo todo lo que soy. Gracias por vuestra paciencia, por vuestros consejos y gracias por quererme tanto.

A Jose, por aguantar mi mal humor (eso te toca por ser la otra mitad), por tu paciencia y tu comprensión. Por los sueños compartidos y los que quedan por compartir.

A mis padres

NUESTRO "ORO" BLANCO DE CADA DÍA

La leche es un precioso regalo de la naturaleza, condición que invita a considerarla como un don divino. En todas las civilizaciones se le han atribuido propiedades milagrosas.

Hace 5000 años, en la época mesolítica, el hombre ya había pasado de un estadio en el que solamente recolectaba y cazaba a otro en el que se dedicaba al cultivo y a la cría de ganado. Un buen día descubrió el ordeño y toda su vida se transformó. A partir de aquel momento, la leche fue considerada como alimento por excelencia, fuente de fortaleza y de vida.

"Según la mitología grecorromana, Hércules, hijo del todopoderoso dios Zeus y de una mortal, fue llevado por su padre para ser alimentado secretamente del pecho de su esposa, la diosa Hera, mientras ella dormía. Hércules succionaba la leche con tanta fuerza, que al dejar de mamar, la leche surgió a borbotones y se derramó. Así, la leche de la diosa le otorgó a Hércules un carácter divino, y las gotas que se dispersaron por el cielo dieron origen a la Vía Láctea."

Como ésta, muchas otras leyendas hacen referencia a la importancia de la leche en diferentes ámbitos, ya sea como alimento, cosmético, medicina...

Tras muchos siglos de historia, cada vez es mayor el interés por conocer con detalle tanto el aspecto estructural, como el funcional, de la leche.

Este estudio trata de dilucidar algunos aspectos sobre la composición química de la leche de oveja, una gran desconocida, y la implicación de algunos de sus componentes en la defensa del neonato frente a determinadas infecciones.

ABREVIATURAS

- AS: ácido siálico
- ASC: ácidos siálicos unidos a caseína
- ASG: ácidos siálicos unidos a glicoproteínas
- ASL: ácidos siálicos libres
- ASO: ácidos siálicos unidos a oligosacáridos
- AST: ácidos siálicos totales
- ASUL: ácidos siálicos unidos a lípidos
- BSA: seroalbúmina bovina
- C: cloroformo
- CHO: colesterol
- CMP: caseinomacropéptido
- ETEC: *Escherichi coli* enterotoxigénica
- FA: ácido graso
- FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- FFA: ácidos grasos libres
- Gal: galactosa
- GalCer: galactosilceramida
- GalNAc: *N*-acetilgalactosamina
- Gb3: globotriaosilceramida
- Gb4: globotetraosilceramida o globósido
- GC: cromatografía de gases
- Gg: gangliósidos
- Glc: glucosa
- GlcCer: glucosilceramida
- GlcNAc: *N*-acetilglucosamina
- HPAEC-PAD: cromatografía de intercambio aniónico a pH alto con detección amperométrica de pulsos
- HPTLC: cromatografía en capa fina de alta resolución
- LacCer: lactosilceramida
- LCFA: ácidos grasos de cadena larga
- LR: lactorreemplazante
- M; MetOH: metanol
- MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
- MCFA: ácidos grasos de cadena media
- MFGM: membrana del glóbulo de grasa de la leche
- MAG: monoacilgliceroles

- MS: espectrometría de masas
- MUFA: ácidos grasos monoinsaturados
- NeuAc: ácido *N*-acetilneuramínico
- NeuGc: ácido *N*-glicolilneuramínico
- PBS: tampón fosfato salino
- PC: fosfatidilcolina
- PE: fosfatidiletanolamina
- PI: fosfatidilinositol
- PIBMC: poliisobutil-metacrilato
- p/p: peso/peso
- PS: fosfatidilserina
- p/v: peso/volumen
- PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
- R_f: movilidad relativa
- SFA: ácidos grasos saturados
- SM: esfingomielina
- TAG: triacilgliceroles
- TCA: ácido tricloroacético
- TLC: cromatografía en capa fina
- Tp: tampón
- UFC: unidades formadoras de colonias
- UPEC: *Escherichia coli* uropatógenicas
- VLCFA: ácidos grasos de cadena muy larga
- v/v: volumen/volumen

1

Introducción

- 1.1. LA LECHE DE OVEJA
 - 1.1.1. Producción de leche
 - 1.1.2. Características generales de la leche de oveja
 - 1.1.3. Composición química de la leche de oveja
 - 1.1.4. Factores que afectan a la composición y producción de leche
 - 1.1.5. La raza Assaf
- 1.2. GLICOCONJUGADOS
 - 1.2.1. Glicoproteínas
 - 1.2.2. Glicolípidos
- 1.3. GANGLIÓSIDOS Y GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS
 - 1.3.1. Nomenclatura
 - 1.3.2. Metabolismo
 - 1.3.3. Funciones
- 1.4. FOSFOLÍPIDOS
- 1.5. ÁCIDOS SIÁLICOS
- 1.6. OLIGOSACÁRIDOS
- 1.7. *ESCHERICHIA COLI*
 - 1.7.1. *E. coli* enterotoxigénicas patógenas de terneros
 - 1.7.2. *E coli* uropatogénicas humanas
 - 1.7.3. La hemaglutinación como modelo de adhesión bacteriana
- 1.8. OBJETIVOS

1.1. LA LECHE DE OVEJA

Aunque es difícil remontarse a los orígenes exactos de la utilización del ganado ovino por el hombre, se sabe, que el rebaño de ovejas ha acompañado el desarrollo de la civilización en el Mediterráneo. En numerosos escritos antiguos, como el Antiguo Testamento, la Iliada, la Odisea o las Bucólicas aparecen relatos pastoriles, en los cuales el rebaño de ovejas acompañaba al hombre de esas épocas. Se encuentran igualmente relatos del ordeño de las ovejas y de la fabricación del queso. La mayor parte de los quesos fabricados hoy en día con leche de oveja son producto de una tradición ancestral. Su origen es tanto más incierto, cuanto que es muy antiguo y está envuelto en leyenda. La leche de oveja se ha considerado siempre como una leche de características específicas, y en ciertos casos, como un producto más noble que las otras leches (Assenat, 1991).

En España, la ganadería ovina ha estado íntimamente ligada al quehacer cotidiano, tanto por su rusticidad y capacidad de aprovechamiento del difícil medio natural, como por su notable versatilidad productiva (carne, leche, lana, piel, estiércol), movilidad (trashumancia) y fácil manejo (docilidad y gregarismo). De ahí la amplia tradición ovejera en nuestro país, donde ya existen vestigios de pinturas rupestres con motivos ovinos (Alacón, Teruel) datados entre el V y IV milenio a.C. (figura 1) (Campo *et al.*, 2008).



Figura 1. Escenas variadas de arte rupestre en el barranco de Los Trepadores de Cerro Montero (Alacón, Teruel), destacando la figura de una oveja.

1.1.1. PRODUCCIÓN DE LECHE

La producción mundial de leche en 1998 según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), supuso más de 550 millones de toneladas, que equivalen a 91.6 kg por habitante. Pero al igual que ocurre con otros subsectores pecuarios, presenta grandes diferencias entre áreas geográficas y entre las diversas especies zootécnicas utilizadas para el ordeño, lo que provoca un mercado muy intenso y diferencias en el consumo a nivel mundial. Según las previsiones de la FAO, la producción mundial de leche alcanzará los 665 millones de toneladas en 2010.

Aunque Europa ha sido la mayor productora de leche a nivel mundial, la tendencia está cambiando en los últimos años, siendo en estos momentos Asia la región productora más sólida (figura 2). España ocupa el sexto lugar en importancia dentro de la Unión Europea.

La producción de leche está repartida de forma muy irregular entre las diferentes áreas geográficas del mundo, sin embargo, cada área presenta una importancia relativa según sea la procedencia de la leche. A nivel mundial el tipo de leche que más se produce es la de vaca, con el 85.3% del total, seguida de la leche de búfala (10.8%), leche de cabra (2.2%), leche de oveja (1.5%) y en último lugar leche de camella cuya producción supone el 0.2% (Hernández *et al.*, 2000).

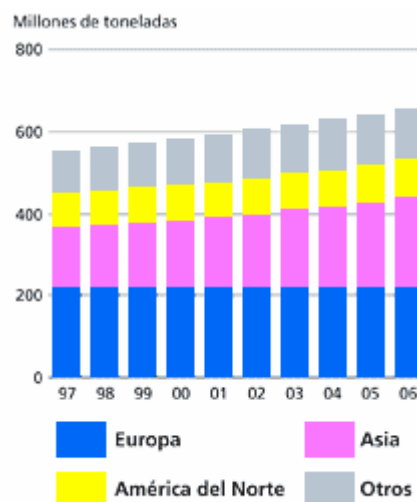


Figura 2. Producción total de leche por regiones.

Según la FAO en el 2005 España ocupaba el séptimo lugar a nivel mundial en la producción de leche de oveja. El 97.0% de la producción española se obtiene en las áreas tradicionales agrícolas de ganado ovino, como son Castilla y León, Castilla-La Mancha, Madrid, el País Vasco y Navarra.

Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) la población de ovejas en 2005 era de 22.9 millones de animales (tabla 1).

Tabla 1. Distribución de la población de ovejas por comunidades autónomas en España.

| Comunidad autónoma | Número de ovejas |
|--------------------|------------------|
| Galicia | 329628 |
| Asturias | 63983 |
| Cantabria | 74063 |
| País Vasco | 354445 |
| Navarra | 753609 |
| La Rioja | 198174 |
| Aragón | 3144790 |
| Cataluña | 947289 |
| Baleares | 336413 |
| Castilla-León | 4042187 |
| Madrid | 119761 |
| Castilla-La Mancha | 3589594 |
| Valencia | 481747 |
| Murcia | 666162 |
| Extremadura | 4545955 |
| Andalucía | 3146572 |
| Canarias | 114204 |
| Total | 22908576 |

En las últimas décadas se ha producido un incremento importante en la producción de leche de oveja en España (305 a 411 millones de litros en el periodo 1992-2003) siendo Castilla y León la región que mayor cantidad produce, el 59.8% del total nacional (MAPA; *Mantecón et al.*, 2007).

1.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LECHE DE OVEJA

La leche de oveja se diferencia de la de vaca y cabra en algunas características, unas directamente observables y otras relacionadas con sus propiedades físicas y químicas.

▸ La leche de oveja es de color blanco nacarado, semejante a la porcelana, debido a que carece de β -carotenos, que son los que confieren el color amarillento a la leche de vaca. Su opacidad es mayor que la de la leche de vaca y de cabra.

▸ Su viscosidad es mayor que la de la leche de vaca, característica ligada a su riqueza.

▸ Tiene una resistencia especialmente elevada a la proliferación de bacterias en las primeras horas que se debe atribuir, en parte, a la actividad inmunológica típica de esta leche. A esto se añade que la leche de oveja tiene doble contenido de minerales que la leche de vaca, siendo su capacidad tamponante claramente superior, lo que representa una ventaja de cara a su conservación. Esto puede convertirse en un inconveniente si se trata esta leche fresca, ya que ofrece una resistencia mayor a las fermentaciones lácticas.

▸ Los productos queseros obtenidos de la leche de oveja tienen ciertas particularidades en su aspecto y en su sabor. La pasta es, en general, más blanca. Estas particularidades se atribuyen a la menor proporción de caseínas α_s respecto a la caseína total. Los sabores típicos y más intensos que tienen la mayor parte de los quesos de leche de oveja se deben, en primer lugar, a la materia grasa. Los triacilglicerol de esta leche tienen una proporción diferente de ácidos grasos. Como ejemplo se puede indicar la proporción particularmente alta de ácido caprílico (C8:0) de 1.7-4.0% en peso de los ácidos grasos totales en la leche de oveja, frente al 1.0-1.8% en la leche de vaca. Lo mismo sucede con el ácido cáprico (C10:0), de 4.0-11.0% en oveja frente a 2.1-3.5% en vaca.

▸ La composición química de la leche de oveja implica un rendimiento quesero mayor que el que se produce con las leches de vaca y de cabra. La práctica cotidiana de la fabricación de queso demuestra que con una misma cantidad de leche, se prepara, por término medio, dos veces más queso con la leche de oveja que con la de vaca. Algunos tipos de quesos son muy conocidos por su alta calidad, al menos en mercados locales o regionales, algunos de ellos incluso tienen prestigio a nivel nacional o europeo. Su origen y calidad a menudo están garantizados por Denominaciones de Origen como es el caso de los quesos de Idiazabal, Roncal, Manchego y Zamorano (*Ugarte et al.*, 2001).

De hecho, hasta hace muy poco tiempo, la fabricación de queso era la principal salida para la leche de oveja. Sin embargo, en 2006, una empresa española desarrolló un procedimiento para poder comercializar esta leche en envases de tetrabrick (también llamados de larga vida). La leche de oveja, al igual que la de cabra, se coagula cuando se somete a altas temperaturas, por eso no se podía envasar ni

someter a procesos de esterilización o UHT. Como veremos a continuación, la leche de oveja tiene una composición que difiere de la de vaca en varios aspectos y que la podría hacer más saludable. Por ejemplo tiene niveles más altos de proteínas, calcio y fósforo, y es más digestiva.

1.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE DE OVEJA

La leche es una distribución compleja de nutrientes que se encuentran organizados en diferentes fases:

- fase acuosa: contiene en disolución la lactosa y la mayoría de los iones.
- fase globular: formada por gotas de grasa rodeadas de una membrana lipoproteica que se encuentra en emulsión gracias a las repulsiones electrostáticas entre las cargas negativas de la envoltura
- fase micelar: constituida por las micelas de caseína y los coloides de otras proteínas lácteas
- fase celular: formada por microorganismos y algunas células extravasadas (macrófagos y linfocitos).

La composición de la leche determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios y muchas de sus propiedades. Aunque en sentido cualitativo la leche tiene una composición y propiedades constantes, cuantitativamente varía entre límites bastante amplios en función de factores tales como la raza, estado de lactación, número de partos, época del año, clima de la región, etc. Y la influencia conjunta de estos factores depende de las especiales circunstancias de cada país.

En la tabla 2 se presenta un resumen de los principales componentes de la leche de oveja, comparada con la de vaca. Se puede observar que la leche de oveja es más rica en grasa, proteínas y extracto seco que la leche de vaca. El contenido de lactosa es prácticamente el mismo, pero hay diferencias en el contenido de sólidos no grasos. La grasa y las proteínas son las que más contribuyen al extracto seco de la leche de oveja: un 74.0% frente a un 56.0% en la leche de vaca.

Tabla 2. Composición de la leche de oveja y vaca (%).

| | Oveja | Vaca |
|----------------------------|--------|------|
| Agua | 82.1 | 88.6 |
| Carbohidratos: lactosa | 4.3 | 4.4 |
| Lípidos | 7.5 | 3.2 |
| - glicéridos (98%) | | |
| - fosfolípidos (0.8%) | | |
| - insaponificables (resto) | | |
| Proteínas | 5.6 | 3.1 |
| - caseínas | 4.3 | 2.5 |
| - proteínas del suero | 1.01 | 0.4 |
| Nitrógeno no proteico | 0.3 | 0.2 |
| Sales minerales | 0.9 | 0.7 |
| Vitaminas, enzimas | Trazas | - |
| Extracto seco | 17.9 | 11.4 |

Ya que no existen en la bibliografía muchos datos que hagan referencia a la composición química de la leche de oveja, la información que se expone a continuación se recoge en el trabajo de *González-Llano y Ramos (1989)*, salvo que se indique otra referencia.

1.1.3.1. Lípidos

Los lípidos figuran entre los componentes más importantes de la leche, siendo fundamentales en los aspectos económico, nutritivo y en las características físicas y organolépticas que se deben a ellos. En general, los quesos de oveja tienen un gusto típico y más sabroso debido a la composición de la materia grasa. La grasa se encuentra en forma de glóbulos con un diámetro medio de 3.3 μm en la leche de oveja, frente a 4.55 μm la de vaca (*Parkash and Jenness., 1968*). Cada glóbulo graso está envuelto por una membrana lipoproteica cargada negativamente que estabiliza la emulsión y protege a los triacilglicerolés del ataque por enzimas lipolíticas.

Los principales componentes de los lípidos son los acilglicerolés (98.7%) y los fosfolípidos (0.8%); los ácidos grasos libres, esterolés, carotenoidés y vitaminas están en pequeñas proporciones.

• **Ácidos grasos**

Los ácidos grasos son los componentes básicos de la materia grasa, ya que representan el 90.0% de los acilgliceroles y tienen gran importancia, puesto que el olor y sabor característicos de la leche de oveja está muy relacionado con los niveles de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono. La leche de oveja tiene una proporción muy elevada de estos ácidos grasos. La proporción relativa de los diferentes ácidos grasos tiene grandes variaciones según la época del año y el período de lactación. Destaca su contenido en ácido caprílico y cáprico dos o tres veces superior al de la leche de vaca. Basándose en estas diferencias es posible detectar mezclas de leche de oveja con leche de vaca.

El contenido en ácidos grasos insaturados de la leche de oveja (2.5-7.5%) es inferior al de la leche de vaca. El porcentaje de ácido oleico es de un 16.0-30.0% frente a un 21.0-28.0% en vaca; sin embargo, el contenido en linoleico y linolénico es ligeramente superior al encontrado en vaca.

• **Triacilgliceroles**

La distribución de ácidos grasos en los triacilgliceroles es similar al de la leche de vaca o cabra. Los ácidos grasos de cadena corta C4 y C6 están esterificados principalmente en las posiciones 1 y 3 y los de 14-15 carbonos en la posición 2. Los ácidos grasos C12-C16 están esterificados con mayor frecuencia en la posición 2 que en la 1 y 3 y el C18 está preferiblemente en 1 y 3.

• **Fosfolípidos**

Los fosfolípidos están distribuidos en la membrana del glóbulo de grasa y en la fase acuosa. El contenido en fosfolípidos de la leche de oveja es semejante al de la leche de vaca. Los ácidos grasos y su distribución es muy similar en ambas leches. Los principales fosfolípidos son fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielina. Se verán con más detalle en un apartado posterior.

• **Lípidos insaponificables**

Desde el punto de vista cuantitativo, en la fracción insaponificable destacan los esteroides, colesterol fundamentalmente, con pequeñas cantidades de lanosterol, dihidrocolesterol y β -sitosterol. La cantidad de colesterol varía con el contenido graso, oscilando entre 15-30 mg/ml.

1.1.3.2. Compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados forman la parte más compleja de la leche. La leche de oveja contiene una media de 0.6% de nitrógeno, distribuido en diferentes fracciones de importancia variada desde el punto de vista de la tecnología láctea y la nutrición. Las proteínas representan aproximadamente el 95.0% del nitrógeno total y solamente un 5.0% es nitrógeno no proteico.

Las proteínas lácteas se presentan en dos fases diferentes: una fase micelar inestable, constituida por micelas en forma de partículas sólidas, micelas en suspensión que difunden la luz y dan a la leche el aspecto blanco opaco; la otra fase es soluble, constituida por diferentes polímeros proteicos hidrofílicos que forman las seroproteínas o proteínas del suero.

• **Caseínas**

Las caseínas son las proteínas mayoritarias de la leche de oveja. Representan aproximadamente entre un 76.0 y un 83.0% de la proteína total (Assenat, 1991). El porcentaje es indicativo de la aptitud quesera de la leche.

Las caseínas se presentan en la leche en forma de un complejo orgánico de proteínas unido a fosfato cálcico coloidal, constituyendo la micela, que está en suspensión estable gracias a la presencia de cargas negativas y grupos hidrofílicos. A pH 4.6, la micela tiene una carga global nula, se agrega y coagula separándose de la fase acuosa; sin embargo, las seroproteínas se mantienen en solución. Observando las micelas de leche de oveja al microscopio electrónico se comprobó que son más pequeñas que las de la leche de vaca, muchas de ellas con un diámetro inferior a 80 nm. También es diferente el contenido en calcio coloidal.

Se han descrito diferentes tipos: las α_s -caseínas (α_{s1} , α_{s2} y α_{s3}), las β (β_1 y β_2) y una κ -caseína (Anifantakis, 1986).

• **Proteínas solubles**

Estas proteínas permanecen solubles en el suero cuando por acidificación o por vía enzimática coagulan las caseínas. Sin embargo, el calentamiento de la leche las desnaturaliza y pierden su solubilidad. Representan un 17.0% de las proteínas totales (Assenat, 1991). El lactosuero de oveja es especialmente rico en estos componentes, por lo que en las regiones donde se utiliza la leche de oveja en la industria quesera, se

la trata mediante coagulación térmica para fabricar quesos como el Recuita, el Bruccio o el Ricotta.

Las proteínas solubles son principalmente β -lactoglobulina, α -lactalbúminas, seroalbúminas, inmunoglobulinas y la fracción proteosa-peptona.

La leche de oveja tiene un mayor contenido en proteínas del suero que la leche de vaca; ambas leches tienen las mismas seroproteínas pero en diferente proporción. Dado el elevado contenido en proteínas del suero de la leche de oveja, la utilización del suero de quesería para la elaboración de nuevos productos como el requesón o recuperación de proteínas es cada vez más frecuente.

• **Nitrógeno no proteico**

Los compuestos nitrogenados de origen no proteico suelen ser productos del metabolismo del nitrógeno que penetran directamente en la leche a partir de la sangre (*Kaufmann and Hagemeister, 1987*).

El contenido en nitrógeno no proteico de la leche de oveja varía del 3.0 al 6.0% del total. Es similar al de la leche de vaca e inferior al de cabra, del 8.7%. Los compuestos nitrogenados no proteicos principales son la urea (45.0%), los aminoácidos (16.0%) y la creatina (2.3%). La creatinina, el ácido úrico y el amonio están en cantidades inferiores al 1.0%.

1.1.3.3. Carbohidratos

El carbohidrato más abundante en la leche de oveja, al igual que en la mayoría de los mamíferos, es la lactosa pero además existen otros compuestos glucídicos, como los oligosacáridos. Éstos últimos serán tratados en un apartado posterior debido a su relevancia en nuestro estudio.

• **Lactosa**

La lactosa es el carbohidrato principal de la leche. Su contenido en la leche de oveja es de 45 a 50 g/kg y representa de un 22.0 a un 27.0% de la materia seca, mientras que en la leche de vaca representa del 33.0 al 40.0%. Sin embargo, este menor contenido en lactosa no ocasiona problemas en la elaboración del queso, ya que la lactosa disponible es suficiente para asegurar la fermentación láctica.

La evolución de la concentración de lactosa a lo largo del período de lactación sigue la misma tendencia que en otras leches decreciendo, aunque no de forma muy

marcada. Además de existir diferencias debido a los factores que influyen en la composición de la leche también pueden existir diferencias importantes en el contenido de lactosa entre la leche de animales individuales (Assenat, 1991).

1.1.3.4. Minerales

El contenido en minerales de la leche de oveja es muy superior al de vaca. Los elementos más abundantes son K, Ca, P, Na y Mg. El Ca y P son los más importantes, tanto desde el punto de vista nutricional como por su papel en el estado físico y estabilidad de las caseínas.

1.1.3.5. Vitaminas

El contenido en vitaminas de la leche de oveja ha sido poco estudiado y son muy pocos los datos bibliográficos existentes. En general se puede decir que la leche de oveja es más rica en la mayor parte de las vitaminas que la leche de otros rumiantes domésticos.

1.1.3.6. Enzimas

En la leche de vaca se han determinado unas 50 enzimas, pero sólo unas pocas han sido estudiadas en la leche de oveja. Las enzimas son constituyentes de la glándula mamaria que pasan a la leche accidentalmente e inevitablemente durante el proceso de secreción. A veces es difícil determinar su origen, ya que las bacterias que frecuentemente se encuentran en la leche también producen enzimas.

1.1.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA COMPOSICIÓN Y PRODUCCIÓN DE LA LECHE

La composición química de la leche de oveja varía en función de numerosos factores.

La raza es uno de los factores que más influyen en la composición de la leche de oveja. Las principales razas de ovejas lecheras fueron descritas por Ballester y Mittaine en 1971. En los países que cuentan con las condiciones geográficas y económicas adecuadas, se tiende a una mejora y selección de la cabaña ovina, para conseguir la máxima producción.

Otro factor importante a tener en cuenta es que la producción de leche es estacional. Por tanto, las variaciones estacionales en la composición están íntimamente ligadas a las variaciones debidas al estado de la lactación.

Desde que se introdujo la mecanización del ordeño, el método para llevarlo a cabo es otro factor relevante. Algunos autores observaron diferencias en la composición de la leche dependiendo de si se obtenía manualmente o de forma mecanizada.

Otro factor importante que influye en la composición de la leche, especialmente en el contenido graso, es la alimentación de la ganadería (*Ramos and Juarez, 1981*).

1.1.5. LA RAZA ASSAF

La oveja (*Ovis aries*) fue domesticada en el Periodo Neolítico, aunque no llegó a Europa hasta el VIII milenio a.C. desde Oriente Medio. La adaptación al medio en el que viven hizo que con el paso de los años surgiesen agrupaciones o razas diferenciadas. Ello se ha debido a los efectos del clima, suelo, altitud, orografía, tipo de pasto, sistema de explotación orientado a la productividad, y sobre todo a la acción del hombre a través de la selección (*Campo et al., 2008*). Según la FAO, existirían 1408 razas ovinas diferentes a nivel mundial, siendo la especie con mayor variabilidad racial.

El 29 de Abril de 2003 se aprobó por el Comité de Razas Español la inclusión como raza de terceros países la raza Assaf (Real Decreto 1682/1997). Esta raza no estaba reconocida en España pese a que en la actualidad el número de ejemplares está cercano al millón. Hoy en día se encuentra incluida en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España.

La raza Assaf de ovejas lecheras (figura 3), originada por un cruce de las razas Awassi y East-Friesian, se desarrolló en Israel durante los años 1950s y 1960s. Ha reemplazado a la Awassi en su país de origen y se ha extendido a otros países Mediterráneos con gran éxito (*Pollot and Gootwine, 2004*).



Figura 3. Oveja de la raza Assaf.

La raza Assaf fue introducida en España en los años 70, destacando su difusión en la comunidad de Castilla y León (figura 4). Especializada en la producción de leche, presenta una superioridad productiva comparada con las razas autóctonas de la región, lo que ha supuesto un cambio racial de los rebaños de ovino (*Jiménez et al.*, 2005).

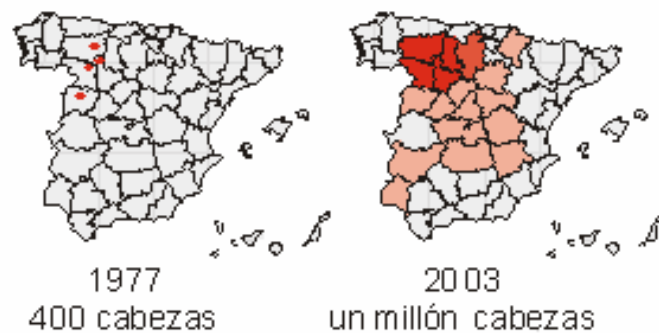


Figura 4. Censos y distribución de la raza Assaf en España en 1977 y 2003.

La población actual se estima alrededor de 700-800.000 animales (tabla 3). Esta raza ha tenido un efecto marcado en la población de ovejas Churras y Castellanas y en la modificación de los sistemas tradicionales de ganadería. Mientras que en 1980 estas razas locales tenían 1.5 y 1.4 millones de ovejas, en 1998 habían disminuido hasta 750.000 y 250.000 ovejas, respectivamente.

En Castilla y León, el 20.0% de la población de ovejas son Assaf, y representan el 49.0% de las ovejas lecheras (*Martínez et al.*, 1999).

Como media, una oveja Assaf sometida a un manejo intensivo produce unos 334 litros de leche durante los 173 días de lactación (*Pollot and Gootwine*, 2004).

Tabla 3. Población de ovejas lecheras en España.

| Raza | Número de ovejas | Porcentaje |
|------------------|------------------|------------|
| Latxa y Carranza | 452620 | 10.2 |
| Churra | 750000 | 17 |
| Castellana | 250000 | 5.7 |
| Manchega | 925000 | 21 |
| Milschaff | 10000 | 0.2 |
| Lacaune | 75000 | 1.7 |
| Awassi | 150000 | 3.4 |
| Assaf | 800000 | 18.1 |
| Cruces | 1000000 | 22.7 |
| Total | 4412620 | 100 |

1.2. LOS GLICOCONJUGADOS

Los glicoconjugados son compuestos formados por la unión covalente entre una fracción glicánica, con multitud de estructuras y composiciones posibles y una parte proteica, para formar glicoproteínas, o lipídica, para formar glicolípidos. Se localizan en la cara exterior de la célula, en la cara interna de orgánulos intracelulares, y también en el citosol y en el núcleo.

Los glicoconjugados están implicados en un gran número de procesos y funciones biológicas, que se pueden resumir en las siguientes (*Newburg*, 1999; *Hakomori*, 2000):

- Reconocimiento intercelular.
- Moduladores de factores de crecimiento y receptores hormonales.
- Mediadores de la adhesión celular.
- Antígenos asociados a tumores y específicos del desarrollo embrionario.
- Receptores de microorganismos y sus toxinas.

1.2.1. GLICOPROTEÍNAS

La gran mayoría de las proteínas de los organismos vivos están glicosiladas. Las uniones entre la parte glucídica y la parte proteica pueden ser por enlaces *N*-glicosídicos o por enlaces *O*-glicosídicos. Los *N*-glicanos presentan un núcleo pentasacárido, común a las tres posibles estructuras con las que aparecen: tipo manosídico, tipo complejo o tipo híbrido, que puede presentar características de los dos anteriores. Los *O*-glicanos están sujetos a un menor número de reglas estructurales, clasificándose según el núcleo oligosacárido que posean.

La leche de oveja, como la leche de otros rumiantes, contiene varias glicoproteínas, fundamentalmente κ -caseína (*O*-glicosilada), lactotransferrina (*N*-glicosilada) y algunas globulinas.

1.2.2. GLICOLÍPIDOS

En general, podemos diferenciar tres grupos dentro de los glicolípidos: los fosfatidilinositoles, los glicoglicerolípidos y los glicoesfingolípidos.

Los fosfatidilinositoles (GPI) están formados por una molécula de fosfatidilinositol unida a un oligosacárido de glucosa y manosa. Son muy importantes en el anclaje de las proteínas a la membrana (*Cole y Hart, 1997*).

En los glicoglicerolípidos los monosacáridos van unidos al carbono 3 del glicerol y pueden ser neutros o ácidos (con restos sulfato). Aparecen en muchos organismos, incluyendo los humanos, como el seminolípido o los sulfotriglicósildiglicéridos de la secreción gástrica. No se conoce su función. Los glicoglicerolípidos y los fosfatidilinositoles no se encuentran en la leche.

Los glicoesfingolípidos son compuestos formados por la unión de al menos un monosacárido y una ceramida y son relativamente abundantes en la leche.

La ceramida está compuesta por una larga cadena de tipo amino-alcohol, que constituye la base esfingoide, unida por un enlace tipo amida a un ácido graso, generalmente de cadena larga y a veces hidroxilada. El grupo alcohol primario de la ceramida es el punto de unión para fosfato, fosfocolina o glúcidos, formándose así ceramida 1-fosfato, esfingomielina o glicoesfingolípidos, respectivamente.

En las células de animales superiores el monosacárido que se une directamente a la ceramida es la glucosa o la galactosa, originándose glucosilceramida (GlcCer) o galactosilceramida (GalCer). En esta última las variaciones son limitadas, pero en el caso de la glucosilceramida, se pueden ir añadiendo sucesivos restos de

monosacáridos. La glucosilceramida se convierte generalmente en lactosilceramida (LacCer) por la adición de galactosa. Sobre esta estructura se pueden seguir añadiendo distintos componentes originando una serie de cadenas tipo que reciben nombres específicos (figura 5).

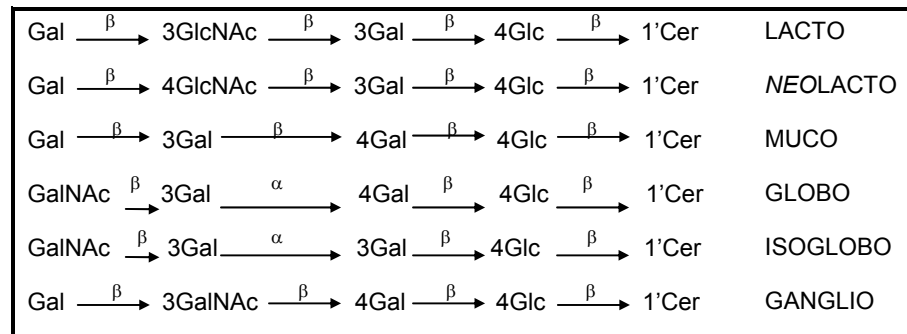


Figura 5. Series a las que pertenecen los glicoesfingolípidos en función de su cadena glucídica. Cuando el glicoesfingolípidio presenta galactosa en lugar de glucosa unida a la ceramida se adscribe a la serie GALA.

En función del tipo de glúcidos que se unan a la base esfingóide, los glicoesfingolípidos pueden ser de dos tipos:

- Glicoesfingolípidos neutros: son aquellos que presentan residuos de monosacáridos no cargados en su cadena oligosacáridica.
- Glicoesfingolípidos ácidos: presentan grupos cargados en su estructura y a su vez pueden ser de varios tipos:
 - Sulfátidos: la ceramida se une a mono o disacáridos sulfatados.
 - Fosfoglicoesfingolípidos: la ceramida se une a una estructura fosfodiéster.
 - Gangliósidos: son glicoesfingolípidos complejos en los que la ceramida se une a una cadena oligosacáridica lineal. Esta cadena puede estar compuesta por glucosa, galactosa, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina, fucosa y ácidos siálicos.

El hecho de que sean moléculas anfipáticas, permite que los glicoesfingolípidos se encuentren anclados a la hemimembrana externa de la membrana plasmática de la célula, presentando las porciones glucídicas hacia el exterior, ocupando la matriz extracelular. Estos dominios glucídicos son esenciales para la comunicación de la célula con su entorno dada su participación en las interacciones célula-célula o como receptores de numerosos patógenos, siendo así una puerta de entrada a la célula para éstos (*Newburg, 1999*).

En la leche, los glicosfingolípidos se encuentran formando parte de la MFGM (figura 6).

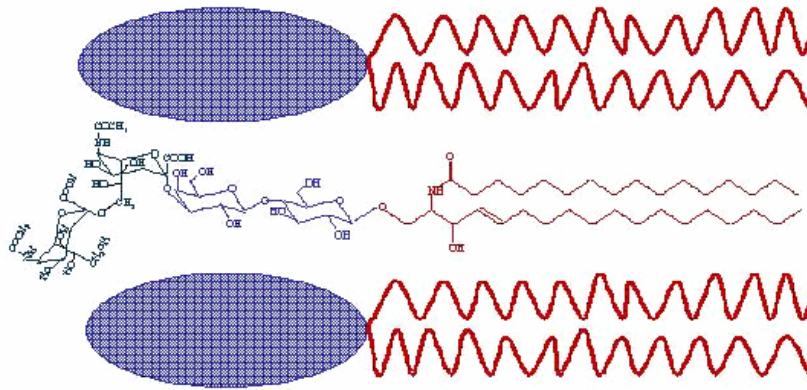


Figura 6. Estructura del gangliósido GD3, integrado en la membrana plasmática entre dos moléculas de fosfoglicéridos. Las partes hidrofóbicas están representadas en rojo y las hidrofílicas en azul.

1.3. GANGLIÓSIDOS Y GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS

Los gangliósidos son glicosfingolípidos ácidos que presentan uno o más residuos de ácidos siálicos en su estructura (Cabezas *et al.*, 1989). Son moléculas anfipáticas que tienen una parte hidrofóbica, la ceramida, formada por una base esfingoide unida a un ácido graso y una parte hidrofílica que está constituida por una cadena oligosacáridica mono- o multisialilada (Tettamanti, 2004). Son glicolípidos ácidos, ya que a pH 7.0 los grupos carboxilo tienen carga negativa.

Los glicosfingolípidos neutros son también moléculas anfipáticas, compuestas por una parte hidrofóbica, la ceramida, y una cadena oligosacáridica hidrofílica (Schweppe *et al.*, 2008) compuesta por uno o varios monosacáridos no cargados. Los cerebrósidos se forman por la unión de la ceramida y una unidad glucídica simple, como glucosa o galactosa, formándose así glucosilceramida o galactosilceramida. Los globósidos se forman por la unión a la ceramida de dos o más monosacáridos, normalmente glucosa, galactosa y *N*-acetilgalactosamina.

1.3.1. NOMENCLATURA

Los glicosfingolípidos neutros presentes en la leche pertenecen a la serie globo (figura 5) y de aquí deriva su nomenclatura. En la tabla 4 podemos observar la estructura y nomenclatura de los más habituales.

Tabla 4. Nomenclatura de glicosfingolípidos neutros.

| ESTRUCTURA | NOMENCLATURA |
|--|---|
| Gal-Cer | Galactosilceramida (GalCer) |
| Glc-Cer | Glucosilceramida (GlcCer) |
| Gal β 1,4Glc-Cer | Lactosilceramida (LacCer) |
| Gal α 1,4Gal β 1,4Glc-Cer | Globotriaosilceramida (Gb ₃) |
| NAcGal β 1,3Gal α 1,4Gal β 1,4Glc-Cer | Globotetraosilceramida ó Globósido (Gb ₄) |

Prestamos mayor atención a la nomenclatura de gangliósidos ya que a pesar de ser moléculas minoritarias, constituyen una de las clases biomoleculares con mayor diversidad química y estructural, lo cual hace de su nomenclatura un campo complejo. El sistema más utilizado es el propuesto por *Svennerholm* en 1963, que aunque no es muy preciso, es sumamente manejable. En él se emplean una serie de letras y números. Una primera letra, G, designa a todos los gangliósidos. Seguidamente se coloca la letra M, D, T ó Q, según sean uno, dos, tres ó cuatro, respectivamente, los restos de ácido siálico que contiene en su molécula. La longitud de la cadena glucídica se representa mediante un subíndice; el 1 indica que la cadena glucídica tiene cuatro restos; el 2, que la cadena carece de la galactosa terminal, el 3, que faltan la galactosa y la *N*-acetilgalactosamina; por último, si es 4, la cadena glucídica consta de un solo monosacárido, la glucosa, unido a la ceramida. Finalmente, las letras a, b ó c servirán para distinguir entre aquellos gangliósidos que sólo difieren en la posición de los ácidos siálicos.

Desde el punto de vista técnico, la nomenclatura propuesta por la IUPAC-IUB (1999) es más correcta, ya que aporta una información más completa que abarca a todos los glicosfingolípidos (más de 300 moléculas diferentes) y permite hacer frente al amplio espectro de estructuras identificadas en los últimos años. También, basándose en la porción glucídica de la molécula, este sistema diferencia las seis cadenas neutras básicas, ya vistas en el apartado de glicosfingolípidos (figura 5). Cada cadena se nombra con su abreviatura más un subíndice que indica el número de

monosacáridos que la forman (de 1 a 4). Un número romano informa de la localización de los sustituyentes, siendo el I el más cercano a la ceramida y el IV el más alejado. Un superíndice latino en dicho número indica el átomo de carbono implicado en la unión.

Aunque la nomenclatura de Svennerholm es más sencilla, se queda corta, ya que se limita exclusivamente a designar la serie ganglio, dejando fuera al resto (lacto, globo, ...) y no da información del tipo de ácido siálico. En la tabla 5 podemos ver algunos ejemplos de gangliósidos identificados con ambas nomenclaturas.

Tabla 5. Designación de los gangliósidos según las nomenclaturas de Svennerholm y de la IUPAC-IUB. Algunos ejemplos.

| Estructura | IUPAC-IB | Svennerholm |
|---|--|-------------|
| NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ - α -Neu5Ac-Gg ₂ Cer | GM3 |
| NeuGc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ - α - Neu5Gc-Gg ₂ Cer | |
| NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ ,V ⁸ - α -Neu5Ac ₂ -Gg ₂ Cer | |
| NeuGc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ - α -Neu5Ac- V ⁸ -Neu5Gc-Gg ₂ Cer | GD3 |
| NeuGc α 2,8NeuGc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ ,V ⁸ - α - Neu5Gc ₂ -Gg ₂ Cer | |
| GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ - α -Neu5Ac-Gg ₃ Cer | GM2 |
| GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ - α - (NeuAc) ₂ -Gg ₃ Cer | GD2 |
| Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ - α -Neu5Ac-Gg ₄ Cer | GM1 |
| NeuAc α 2,3Gal β 1,4GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ ,IV ³ - α -Neu5Ac ₂ -Gg ₄ Cer | GD1a |
| Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,8 NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ , V ⁸ - α -Neu5Ac ₂ -Gg ₄ Cer | GD1b |
| NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ , IV ³ , VI ⁸ - α -Neu5Ac ₃ Gg ₄ Cer | GT1a |
| NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ , IV ³ , V ⁸ - α -Neu5Ac ₃ -Gg ₄ Cer | GT1b |
| NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer | II ³ , IV ³ , V ⁸ VII ⁸ - α -Neu5Ac ₄ -Gg ₄ Cer | GQ1b |

En la figura 7 podemos observar un esquema básico de la estructura de los glicoesfingolípidos.

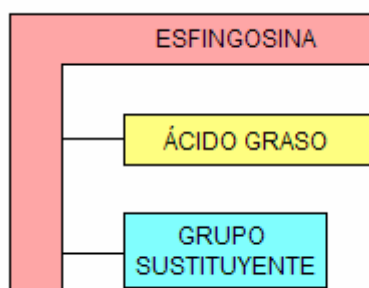



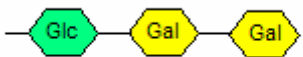

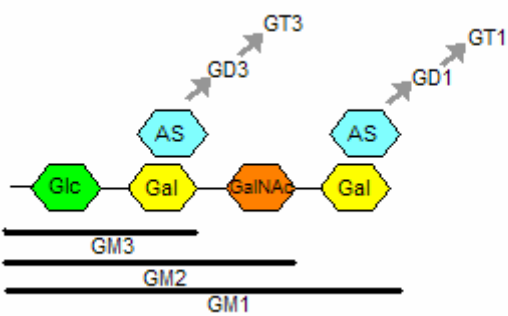


Figura 7. Estructura general de los glicoesfingolípidos.

Dependiendo del grupo sustituyente obtenemos los distintos glicoesfingolípidos neutros y gangliósidos (tabla 6).

Tabla 6. Estructura de los diferentes sustituyentes de la ceramida (figura 7) para formar glicoesfingolípidos neutros y gangliósidos.

| ESFINGOLÍPIDO | GRUPO SUSTITUYENTE | ESTRUCTURA |
|------------------------------------|------------------------|--|
| Ceramida | - | — H |
| Glucosilceramida | Glucosa |  |
| Galactosilceramida | Galactosa |  |
| Lactosilceramida | Disacárido |  |
| Globotriaosilceramida | Trisacárido |  |
| Globotetraosilceramida (Globósido) | Tetrasacárido |  |
| Gangliósidos | Oligosacárido complejo |  |

* Representación esquemática de la cadena oligosacárida de los principales gangliósidos así como su nomenclatura básica. (Las flechas en gris representan la adición de un ácido siálico).

1.3.2. METABOLISMO

Tanto gangliósidos como glicoesfingolípidos neutros comparten las mismas rutas metabólicas, así que hablaremos de glicoesfingolípidos en general para referirnos a ambos grupos de compuestos.

1.3.2.1. Biosíntesis *de novo*

La biosíntesis de los glicoesfingolípidos tiene lugar en las membranas intracelulares (retículo endoplasmático y aparato de Golgi) y es catalizada por enzimas asociadas a estas membranas. El transporte de los glicoesfingolípidos sintetizados *de novo* hacia la membrana plasmática, ocurre mediante vesículas que siguen la ruta exocítica (Maccioni *et al.*, 1999; Kolter *et al.*, 2002).

El primer paso es la formación de la ceramida. La serina-(palmitoil/estearil) transferasa lleva a cabo la condensación de palmitoil o estearil-CoA con serina para formar β -cetohidroxi esfingosina (C:18 y C:20 son las más frecuentes en vertebrados) que se reduce a continuación para dar hidroxidihidro esfingosina. Esta reducción la lleva a cabo la 3-cetoesfingonina reductasa a expensas de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Un acil-CoA es el donador necesario para que la dihidroceramida sintasa lleve a cabo la acilación de este compuesto, formándose dihidroceramida. Por último la dihidroceramida desaturasa utiliza $\text{NADH} + \text{H}^+$ y O_2 para introducir en este compuesto una desaturación en C4-C5 y formar así la ceramida.

Todas las enzimas implicadas en este proceso se encuentran localizadas en la membrana del retículo endoplasmático, orientadas hacia el citosol (Tettamanti, 2004).

Parte de la ceramida recién sintetizada queda en el retículo endoplasmático y se transloca a la parte luminal de la membrana, donde es galactosilada por acción de una ceramida galactosiltransferasa para formar GalCer.

Otra parte de la ceramida recién sintetizada en el retículo pasa al cis-Golgi por un mecanismo que no se conoce muy bien, y eventualmente se inserta en la cara citosólica de la membrana. Aquí la ceramida es glucosilada por la acción de una glucosiltransferasa. Una flipasa, todavía no caracterizada, es la responsable de la translocación de la GlcCer a la cara luminal del cis-Golgi. Es aquí donde tendrán lugar las sucesivas glicosilaciones. La primera de ellas es la galactosilación de la GlcCer por la acción de la lactosil-ceramida sintasa, para formar LacCer (Nomurova *et al.*, 1998). La LacCer es la unidad estructural y el precursor común de la mayoría de los glicolípidos que se encuentran en vertebrados (Huwiler *et al.*, 2000).

La LacCer es sialilada a GM3, el cual es sialilado a GD3 y éste es sialilado a GT3. Estas sialilaciones son llevadas a cabo por tres sialiltransferasas diferentes (SAT I, SAT II y SAT III), cada una de las cuales reconoce a su sustrato de forma específica.

LacCer, GM3, GD3 y GT3 sirven como punto de partida para la síntesis de gangliósidos de las series 0, a, b y c, respectivamente (Tettamanti, 2004) (figura 8).

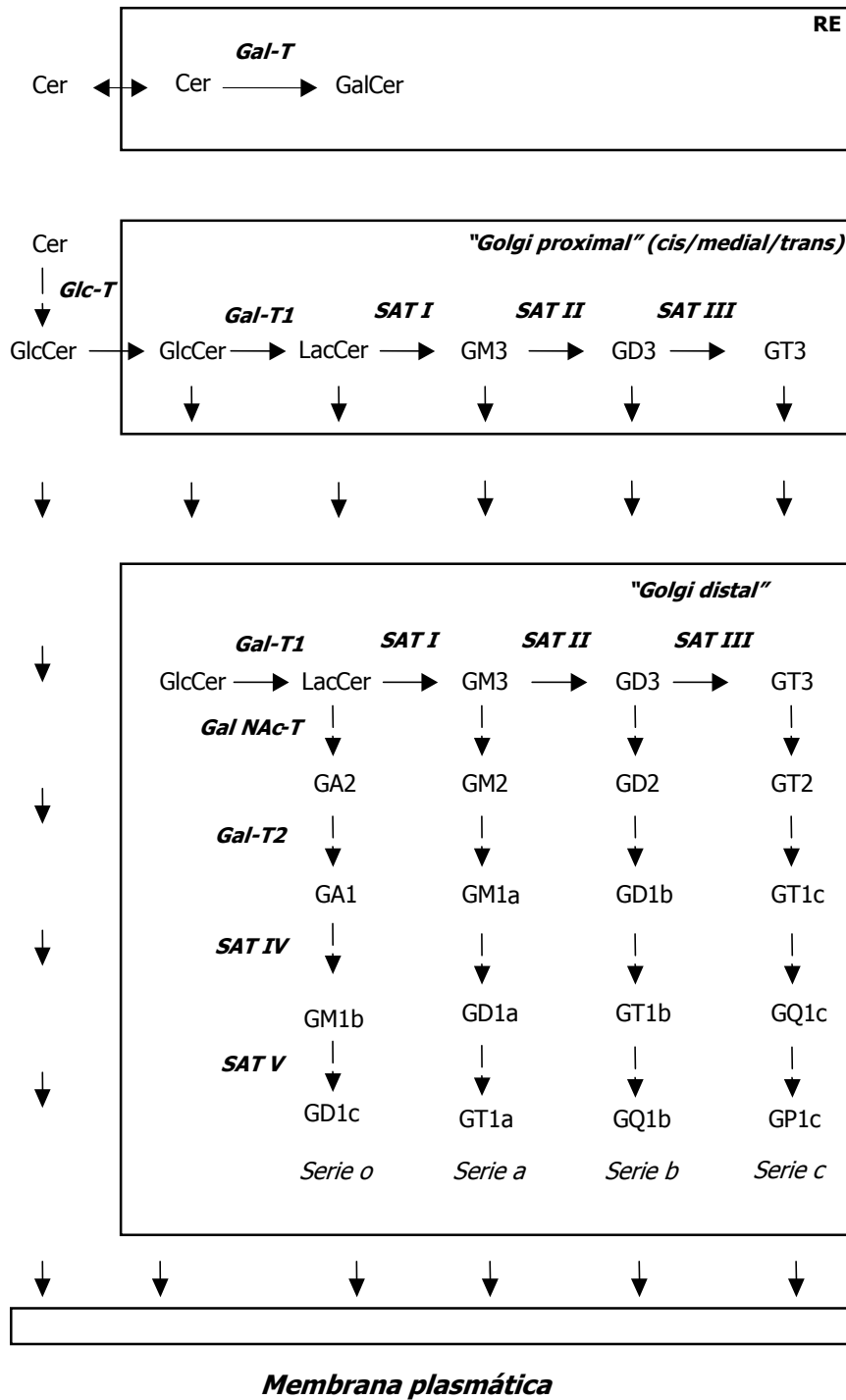


Figura 8. Esquema de la síntesis de gangliósidos a lo largo del aparato de Golgi y el TGN. Los pasos indicados dentro de los compartimentos ocurren en el lado luminal, y sus productos parecen moverse a la membrana plasmática por transporte vesicular. Los pasos que aparecen fuera de los compartimentos son reacciones catalizadas por enzimas unidas a la membrana que tienen lugar en la cara citosólica del Golgi y cuyos productos viajan a la membrana plasmática mediante un mecanismo de transporte no vesicular.

Glc-T: Glucosiltransferasa; **Gal-T:** Galactosiltransferasa; **GalNAc-T:** N-acetil galactosaminiltransferasa; **SAT:** Sialiltransferasa.

La síntesis de los gangliósidos más complejos de las diferentes series se lleva a cabo por la introducción secuencial de *N*-acetil galactosamina (*N*-acetil galactosaminiltransferasa), galactosa (galactosiltransferasa) y ácido siálico (sialiltransferasa, SAT IV). Se pueden llevar a cabo otras sialilaciones posteriores por la sialiltransferasa V (SAT V).

Los gangliósidos de la serie 0 se forman a partir de LacCer por la acción secuencial de *N*-acetil galactosaminiltransferasa, galactosiltransferasa y sialiltransferasas IV y V, formándose GA2 (asialo-GM2), GA1 (asialo-GM1) y los gangliósidos GM1b, GD1c y GD1 α (Tettamanti, 2004).

En los gangliósidos, como en otros glicoconjugados, los residuos de ácido siálico se unen exclusivamente en configuración α . Ésto puede estar relacionado con el mecanismo de acción de las sialiltransferasas (Huwiler et al., 2000).

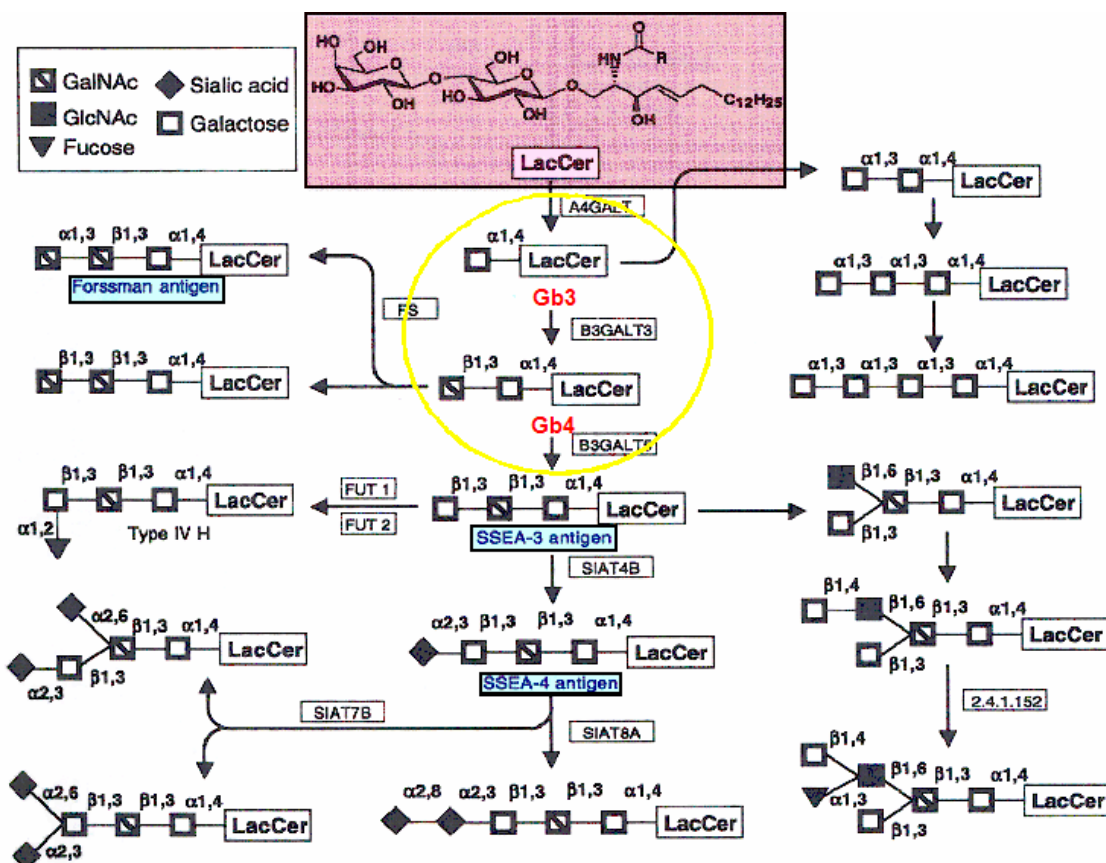


Figura 9. Esquema de la síntesis de globósidos.

Los glicosfingolípidos neutros comparten la ruta de síntesis con los gangliósidos hasta que se forma la lactosilceramida. En la figura 9 se muestra un esquema de la síntesis de los globósidos. Muchos de ellos son antígenos presentes en la sangre, pero en el caso de la leche sólo se han descrito dos, el Gb3 y Gb4.

A partir de la LacCer se forma el Gb3 por acción de una galactosiltransferasa, y el Gb3 se transforma en Gb4 mediante la acción de una *N*-acetilgalatosaminiltransferasa (figura 9).

Hay evidencias que hacen pensar en la existencia de un gradiente de distribución de las glicosiltransferasas a lo largo del aparato de Golgi (*Tettamanti, 2004*), ya que las primeras glicosilaciones ocurren en la porción cis y media del Golgi y las últimas en la región trans. Ésto implicaría un flujo vesicular entre las diferentes zonas del Golgi al igual que ocurre en el caso de las glicoproteínas.

Es interesante destacar que las características del dominio transmembrana de las glicosiltransferasas que actúan en la síntesis de glicosfingolípidos, permiten la asociación entre ellas y con otras proteínas de membrana, lo que contribuye a prevenir su inclusión en las vesículas favoreciendo así su permanencia en la región del Golgi que les corresponda (*Martina et al., 1998; Giraud et al., 2001*). Además, se han descrito casos en los que las glicosiltransferasas se encuentran formando complejos, donde el producto de la primera enzima es procesado inmediatamente por la siguiente y así sucesivamente hasta formar el producto final. Ésto apoya la hipótesis de que cada gangliósido individual es sintetizado por un complejo multiglicosiltransferasa (*Roseman, 1970; Basu et al., 1980*).

Los productos finales de la biosíntesis de glicosfingolípidos son incluidos en vesículas para su transporte hacia la membrana plasmática (*Tettamanti, 2004*).

1.3.2.2. Degradación

El catabolismo de los glicosfingolípidos consiste en la eliminación secuencial e individual de cada monosacárido, comenzando por el extremo no reductor. Este proceso es llevado a cabo por las exoglicohidrolasas, que son enzimas solubles. El producto final, la ceramida, puede en ocasiones ser degradada por una ceramidasa para dar la base esfingoide y el ácido graso (*Huwiler et al., 2000; Kolter et al., 2002*). El proceso de degradación ocurre a través de las rutas de endocitosis en endosomas y lisosomas, y todos los pasos enzimáticos del proceso degradativo requieren un pH ácido en el interior del orgánulo.

En el caso de los gangliósidos el proceso comienza con la transformación de los multi-sialogangliósidos mediante una sialidasa lisosómica en sus correspondientes mono-sialogangliósidos GM1 y GM2 (no susceptibles a esta enzima) o LacCer (a partir de GM3).

Una β -galactosidasa elimina una galactosa de GM1 para formar GM2, y una β -*N*-acetil-hexosaminidasa es la responsable de eliminar la *N*-acetilgalactosamina de GM2 para dar GM3. En algunas células los ácidos siálicos se eliminan de GM1 y GM2 por sialidasas específicas (GM1 y GM2 sialidasas), dando lugar a los correspondientes asialoderivados GA1 y GA2, que por acción de la β -galactosidasa y β -*N*-acetil-hexosaminidasa en el primer caso, o sólo de la β -*N*-acetil-hexosaminidasa en el segundo, dan lugar a LacCer. La existencia de GM2 y GM1 sialidasas fue descrita por primera vez en 1971 por *Kolodny et al.* La LacCer se degrada hasta ceramida por la actuación secuencial de β -galactosidasa y β -glucosidasa. *In vivo*, la degradación intralisosómica de la mayoría de los glicoesfingolípidos requiere la actuación de un efector junto a las exoglicohidrolasas; estos efectores o activadores son las denominadas proteínas activadoras de esfingolípidos (SAPs o saposinas y otras) (*Huwiler et al.*, 2000). Existe una ruta alternativa para la degradación de gangliósidos, que consiste en la ruptura del enlace β -glucosídico que existe entre la glucosa y la ceramida, dando lugar a la ceramida y el oligosacárido. Las enzimas responsables de llevar a cabo este proceso son endoglicosidasas o ceramida glicanasas (*Ito et al.*, 1986) y requieren para su actuación activadores proteicos específicos, solubles, esenciales en los procesos *in vivo*.

En el caso de los glicoesfingolípidos neutros una hexosaminidasa elimina la *N*-acetilgalactosamina terminal del Gb4 para formar Gb3, y una α -galactosidasa elimina una galactosa del Gb3 para formar LacCer. Ésta se degrada como ya se explicó anteriormente.

Los defectos en algunas enzimas de estas rutas de degradación suponen la acumulación de ciertos compuestos, dando lugar a la aparición de diversas enfermedades. Así, de la misma forma que la acumulación del gangliósido GM2 da lugar a la enfermedad de Tay-Sachs, la acumulación de Gb3 causa la enfermedad de Fabry (*Pintos*, 2002).

1.3.2.3. Proceso de recambio

En la célula tienen lugar una serie de procesos que permiten mantener los glicoesfingolípidos en las proporciones y el estado adecuado.

1. Eventos metabólicos a nivel de la membrana plasmática.

Los glicoconjugados son susceptibles de ser glicosilados y desglicosilados *in situ*, cuando se encuentran insertos en la membrana plasmática, por la acción de enzimas asociadas a ella. En concreto, se sabe que el ácido siálico unido a membrana puede sufrir un recambio local a este nivel. De hecho, la membrana plasmática de muchas células porta una sialidasa que elimina ácidos siálicos de multisialogangliósidos produciendo GM1 y GM2 o LacCer (*Tettamanti et al.*, 1972).

2. Procesos de glicosilación directa.

Existen datos que hacen pensar que los gangliósidos exógenos, que son internalizados por exocitosis, pueden llegar al aparato de Golgi, donde son glicosilados y posteriormente liberados hacia la membrana plasmática. Estos procesos de glicosilación son otro instrumento que contribuye a la remodelación de la composición de los glicoesfingolípidos de membrana (*Tettamanti*, 2004).

3. Rutas de salvamento o recuperación.

Los gangliósidos endocitados llegan, al menos en parte, a endosomas tardíos y lisosomas, donde son degradados. En estos orgánulos se acumulan tanto los productos finales de su degradación (monosacáridos, bases de cadena larga, ácidos grasos), como productos intermediarios (LacCer, GlcCer y ceramida). Estos fragmentos dejan los lisosomas y llegan al citosol, donde pueden sufrir procesos biosintéticos o catabólicos. La salida de estos fragmentos de los endosomas tardíos o lisosomas podría estar basada en una difusión espontánea (*Riboni et al.*, 1998) como en el caso de las bases, o sometida a un sistema de transporte, como en el caso de los ácidos siálicos (*Mancini et al.*, 1989). El uso de estos productos catabólicos para la biosíntesis constituye los procesos metabólicos de salvamento o recuperación.

4. Reciclado (sin modificaciones metabólicas).

Existe una parte de los gangliósidos que son internalizados en vesículas y son devueltos a la membrana sin sufrir ninguna modificación, a partir de endosomas tempranos.

Resumiendo, los procesos a tener en cuenta en el metabolismo de los glicosfingolípidos son los siguientes (figura 10):

- A. biosíntesis *de novo*
- B. degradación
- C. modificaciones a nivel de membrana plasmática
- D. glicosilaciones directas en el aparato de Golgi
- E. rutas de salvamento o recuperación
- F. reciclado desde endosomas tempranos

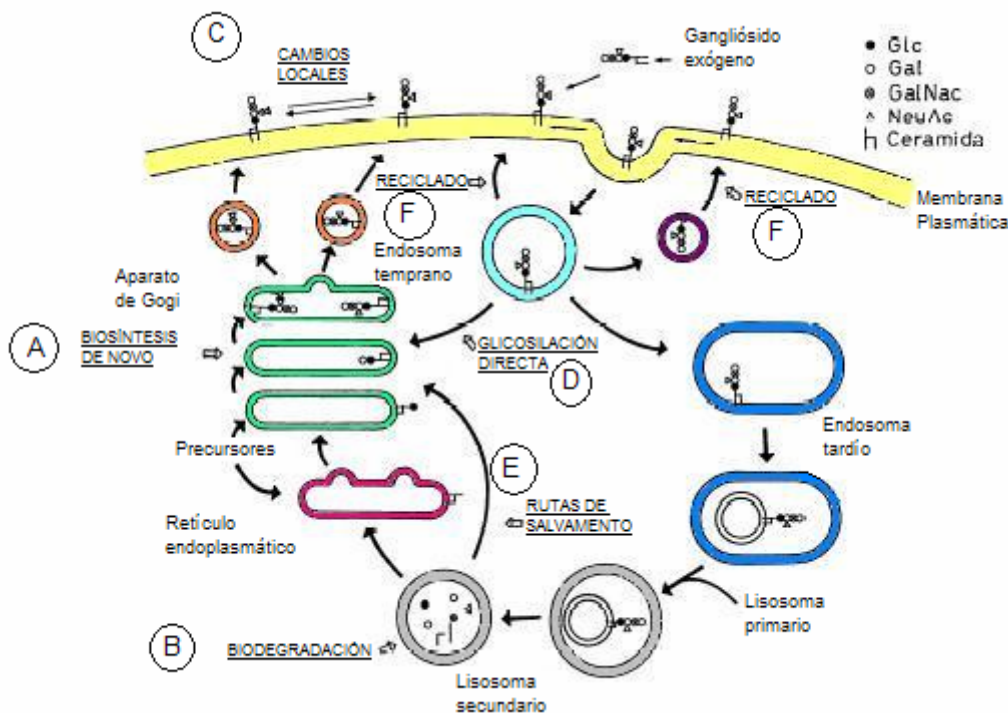


Figura 10. Esquema del metabolismo y tráfico intracelular de gangliósidos.

Existen estudios sobre la contribución que cada uno de estos procesos al metabolismo de los glicoesfingolípidos. La biosíntesis *de novo* representa el 35.0% (10.0-90.0%), las glicosilaciones directas suponen un 7.0% (5.0-10.0%), y las rutas de recuperación representan el 58.0% (10.0-90.0%). Los márgenes de variación son amplios debido a que los resultados dependen del tipo de célula en el que se haga el estudio (*Tettamanti, 2004*).

También se han hecho estudios para determinar la vida media de un gangliósido, que oscila entre 6.5 horas y 2.8 días, dependiendo del tipo celular (*Tettamanti, 2004*).

1.3.3. FUNCIONES

Como ya se ha recogido en algún otro lugar de esta memoria, se cree que los gangliósidos podrían estar implicados en numerosos procesos biológicos. La naturaleza anfifílica de los glicoesfingolípidos, y por tanto de los gangliósidos, les permite su separación lateral en la membrana influyendo en su curvatura y asimetría y permitiendo su segregación junto con el colesterol y proteínas de membrana, dando lugar a la formación de microdominios de membrana con una composición y función determinadas, tales como los "rafts lipídicos", caveolas, etc. (*Simons et al., 1999*). Estos microdominios conteniendo glicoesfingolípidos/gangliósidos, también denominados plataformas de unión y señalización, podrían participar en algunas de las funciones de los gangliósidos, como la adhesión y reconocimiento celulares y la transducción de señales (*Fantini et al., 2000; Hakomori, 2000; Hoessli et al., 2000*).

Ciertos estímulos pueden provocar la hidrólisis de los gangliósidos de la membrana, con la consiguiente liberación de alguno de sus componentes que puede actuar como segundo mensajero o biorregulador celular (*Hannun and Obeid, 2002*). También modulan el comportamiento de receptores de factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular (*Hakomori, 1991*).

Los gangliósidos actúan como receptores para ciertas toxinas, como es el caso de la toxina colérica, que se une a GM1 (*Heyningen et al., 1971*) y también se une con algunos virus como el de la rabia, gripe y Sendai (*Suzuki et al., 1985; Haywood and Boyer, 1986; Superti et al., 1986*).

Por su estructura cargada y su abundancia en el sistema nervioso, pueden desempeñar un papel en la transmisión del impulso nervioso (*Rahman, 1992*), en la formación de nuevas sinapsis entre neuronas o competir eficazmente con algunas sustancias neurotóxicas (*Gupta et al., 1990; Skaper et al., 1990*).

También se ha propuesto su intervención en procesos de aprendizaje y modulación del comportamiento (Popov et al., 1988).

En el caso concreto de la leche, la mayoría de los gangliósidos se encuentran en la membrana del glóbulo de grasa (Keenan et al., 1972a y b; Keenan, 1974), la cual deriva directamente de la membrana plasmática de la célula productora de leche de la glándula mamaria (Heid and Keenan, 2005). Los gangliósidos pueden aumentar la carga negativa de los glóbulos de grasa y así incrementar la estabilidad de la suspensión de lípidos en la fase acuosa (Huang, 1973). Pero en general, hay dos líneas preferentes a la hora de explicar su función en la leche: la primera los considera como factores de protección para el recién nacido, mientras que la segunda les otorga un papel nutricional.

1- Los gangliósidos como factores de protección.

Una de las características más importantes de los gangliósidos es su capacidad para unirse y bloquear cierto tipo de toxinas. Este es el caso de GM1 y la toxina colérica (Heyningen et al., 1971). También se ha experimentado con respecto a su unión a toxina tetánica (Walton et al., 1988) y botulínica (Kozaki et al., 1987). Además se ha descrito la unión de fimbrias de *Escherichia coli* K99 a GM3 (Martín et al., 2003).

Existen otros muchos estudios sobre la unión de gangliósidos diferentes a distintos organismos, tales como es el caso de algunos virus (ya citados anteriormente), *Actinomyces naeslundii* y GM1 y GD1b (Brennan et al., 1987), *Neisseria gonorrhoeae* y GM1 (Deal and Krivan, 1990) o *Bordetella pertussis* con varios gangliósidos desialilados (Brennan et al., 1991).

Andersson et al. (1986), comprobaron que la leche humana inhibe la unión de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* a las células epiteliales bucales y faríngeas humanas. Aunque no identifican el componente responsable de esta inhibición, no tiene que ver con las inmunoglobulinas, sino con los glicolípidos.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es lógico pensar que los gangliósidos forman parte de los mecanismos de protección no inmunitaria que recibe el recién nacido. Su situación en la parte externa del glóbulo de grasa les confiere una gran superficie de contacto con el medio (se ha calculado que 1 ml de calostro bovino tiene unos 6000 cm² de material de membrana) (Brunner, 1974).

Otnaess *et al.* (1983) encuentran que los gangliósidos contenidos en 2 ml de leche humana inhiben completamente la acción de 0.1 μg de toxina colérica en intestino de conejo, tanto *in vivo* con *in vitro*.

Por tanto, si estas hipótesis son ciertas, los gangliósidos de la leche competirían eficazmente con los receptores de toxinas y microorganismos patógenos presentes en las mucosas epiteliales, bloqueando o atenuando la infección.

2- Los gangliósidos como elementos nutricionales.

En los últimos años ha aumentado exponencialmente la consideración de los esfingolípidos en general y de los gangliósidos y glicosfingolípidos neutros en particular como constituyentes funcionales de los alimentos, con un consumo aproximado de 120 g/persona/año (Vesper *et al.*, 1999). Se ha descrito su participación en la reducción de los niveles de colesterol ligado a LDL en suero y en la inhibición de la carcinogénesis en el colon (Vesper *et al.*, 1999; Dewettinck *et al.*, 2008).

La administración de algunos gangliósidos en animales de experimentación mejora los procesos de aprendizaje y memoria de los individuos. Popov *et al.* (1988) demostraron que GM1 y GT1 presentan esta propiedad cuando se administran en forma de inyección intraventricular; sin embargo, no se detecta ningún efecto si se trabaja con GD1a y GD1b.

La utilidad farmacológica de los gangliósidos como activadores del desarrollo neuronal también indica un posible papel en la evolución postnatal del sistema nervioso del recién nacido, durante el período en que sus propios mecanismos metabólicos no están aún desarrollados.

De la misma forma que ocurre con los gangliósidos, los glicosfingolípidos neutros de la serie globo presentes en la leche también son capaces de unirse a determinados patógenos por lo que también tienen carácter protector. Gb3 es capaz de unirse a la toxina Shiga 1 (Schweppe *et al.*, 2008) y a las toxinas tipo Shiga 1 y 2, y también a las fimbrias P de las *E. coli* uropatógenas. Gb4 se une a las fimbrias P y a la variante 2 de la toxina tipo Shiga. Parece ser que la secuencia α 1-4Gal presente en estos dos compuestos es la estructura que actúa como receptor para las adhesinas de *E. coli* patógenas y como receptor para toxinas (Newburg and Chaturvedi, 1992).

En la leche de vaca, glucosilceramida y lactosilceramida son los glicosfingolípidos neutros más abundantes. Por el contrario, en la leche humana el mayoritario es la galactosilceramida seguida por lactosilceramida. La leche humana tiene además pequeñas cantidades de Gb3 y Gb4. En la leche de vaca aparecen en ocasiones pequeñas cantidades de Gb3, pero no tiene Gb4.

1.4. FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos son lípidos complejos, que se encuentran formando parte de la bicapa lipídica de las membranas celulares. Por eso también se les denomina lípidos de membrana. Son compuestos anfipáticos, y en contacto con el agua se disponen formando bicapas, en las que los grupos lipofílicos quedan en la parte interior y los grupos hidrofílicos en la exterior, enfrentados a las moléculas de agua.

Todos los fosfolípidos de la leche pertenecen al grupo de los glicerofosfolípidos, excepto la esfingomielina, que es un fosfoesfingolípidos.

Los glicerofosfolípidos se forman por la unión de un ácido fosfatídico con un alcohol o un aminoalcohol. El ácido fosfatídico es un éster de una molécula de ácido ortofosfórico con un diacilglicerol que tiene un ácido graso insaturado (figura 11).

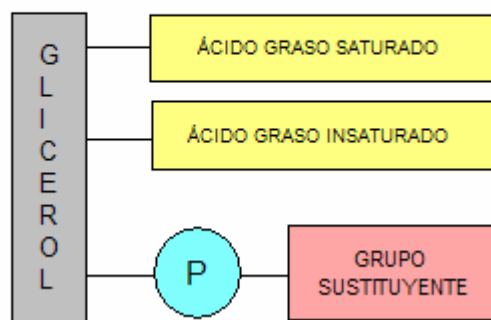
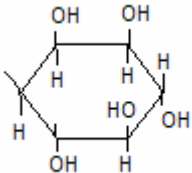


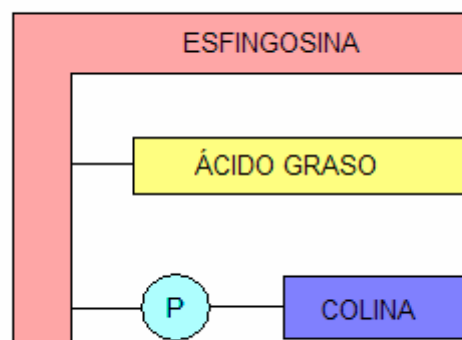
Figura 11. Estructura de un glicerofosfolípido.

En la leche de oveja podemos encontrar varios fosfolípidos diferentes: fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilcolina (PC) (Tabla 7).

Tabla 7. Glicerofosfolípidos presentes en la leche.

| GLICEROFOSFOLÍPIDO | GRUPO SUSTITUYENTE | ESTRUCTURA | CARGA NETA (pH 7) |
|-----------------------|--------------------|--|-------------------|
| Ácido fosfatídico | - | —H | -1 |
| Fosfatidiletanolamina | Etanolamina | —CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ H ₃ | 0 |
| Fosfatidilcolina | Colina | —CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃ | 0 |
| Fosfatidilserina | Serina | —CH ₂ —CH—N ⁺ H ₃ COO ⁻ | -1 |
| Fosfatidilinositol | Inositol |  | -1 |

Los fosfoesfingolípidos son lípidos con una estructura derivada de una aminoalcohol insaturado, la esfingosina, que unida a un ácido graso da lugar a una ceramida. La esfingomielinina se forma por la unión de una fosfocolina a esta ceramida (figura 12).

**Figura 12.** Estructura de la esfingomielinina.

Los fosfolípidos de la leche se encuentran en el suero y en la membrana que rodea el glóbulo de grasa. Son importantes tanto en la síntesis de los lípidos de la leche como en la estructura de la membrana del glóbulo de grasa. Desde el punto de vista tecnológico, tienen una importancia considerable en productos derivados de la grasa de la leche debido a su inestabilidad oxidativa.

La distribución de los fosfolípidos individuales en la leche es bastante regular entre especies, y el contenido total de fosfolípidos que contienen colina es casi constante. Parece razonable pensar que los fosfolípidos tienen funciones similares en todas las leches (*Morrison, 1968*).

La leche humana y de caballo contiene más fosfolípidos que la leche de rumiantes. También se encontró que los fosfolípidos de la leche de vaca, oveja y cabra incrementan con el aumento de la grasa, pero no cambian en la leche de búfalo.

La leche de rumiantes contiene cantidades significativas de ácidos grasos ramificados y de número impar de átomos de carbono, mientras que estos ácidos grasos están ausentes en fosfolípidos de la leche humana (*Morrison and Smith, 1967*).

En los últimos años, los fosfolípidos y esfingolípidos han recibido especial interés por sus efectos positivos sobre la salud humana. Algunas de estas características son su habilidad para reducir los niveles de colesterol en sangre y mejorar las funciones cerebrales, sus propiedades antioxidativas y sus propiedades bacteriostáticas. También se ha estudiado el efecto inhibitorio de los esfingolípidos en el cáncer de colon. Además, los lípidos polares se usan comúnmente por sus cualidades funcionales y emulsificantes en varios sistemas de alimentos (*Noh and Koo, 2004; Dewettinck et al, 2008*).

Los productos derivados de la leche son una buena fuente de estos fosfolípidos. La membrana de los glóbulos de grasa de la leche está formada por una tercera parte de fosfolípidos y esfingolípidos, estabilizando los glóbulos de grasa en la fase acuosa de la misma (*Rombaut et al., 2005*).

De hecho, recientemente se han utilizado fosfolípidos de la membrana de los glóbulos de grasa de la leche para la preparación de liposomas. Los liposomas son estructuras esféricas formadas por una o varias bicapas de fosfolípidos que encierran un núcleo acuoso en su interior. Generalmente se obtienen a partir de extractos de fosfolípidos muy purificados procedentes de soja o de yema de huevo. Estas estructuras podrían tener una gran variedad de aplicaciones, entre ellas destaca su función en el entrapamiento y liberación controlada de drogas e ingredientes o alimentos funcionales y como modelos celulares y de membrana. La obtención de fosfolípidos a partir de soja y yema de huevo tiene un coste elevado, por lo que en los últimos años se ha prestado interés al aislamiento de fosfolípidos y esfingolípidos de la membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM) que se obtiene a partir de productos de desecho de las industrias lácteas. Ésta sería una fuente de obtención con un coste menos elevado (*Thompson et al., 2006a y b*).

1.5. ÁCIDOS SIÁLICOS

Ácido siálico es el término general utilizado para denominar a una familia de monosacáridos de 9 átomos de carbono derivados del ácido neuramínico. Este compuesto es una cetosa que resulta de la condensación del ácido pirúvico con la *D*-manosamina. El ácido neuramínico no existe en estado libre en la naturaleza, sino que siempre se presenta en forma de derivados.

Blix (1936) y Klenk (1941) descubrieron el ácido *N*-acetilneuramínico (NeuAc) como producto de la hidrólisis suave de los glicolípidos de cerebro. Desde entonces se usa el término ácido neuramínico para referirse al compuesto más sencillo no encontrado en la naturaleza, mientras que el de ácidos siálicos se refiere a sus derivados acilados.

El nombre de estos ácidos procede de la palabra griega que significa saliva, pues en principio fueron descubiertos en glándula submaxilar bovina. Su descubrimiento estuvo íntimamente ligado al de los gangliósidos, lípidos que contienen en su composición uno o varios ácidos siálicos.

En el caso concreto de la leche, los ácidos siálicos fueron descubiertos por *Kuhn y Brossmer* (1954) y por *Zilliken et al.* (1955), quienes los denominaron respectivamente ácidos lactámico y ginamínico. Posteriormente, Klenk y Uhlenbruck demostraron que ambas sustancias eran similares al ácido *N*-acetilneuramínico descrito con anterioridad.

Hoy en día se conocen más de 40 representantes de esta familia y no aparecen en plantas, ni en la mayoría de los invertebrados, aunque sí se ha detectado su presencia en algunas bacterias y virus. Por lo general su presencia se limita a los animales deuteróstomos (*Varki*, 1999).

Como ya se expuso anteriormente, todos los ácidos siálicos derivan del ácido neuramínico por diversas sustituciones en los grupos amino e hidroxilo. El grupo amino puede estar acetilado (NeuAc) o glicolilado (ácido *N*-glicolilneuramínico), mientras que en los grupos hidroxilo puede haber uno o varios grupos acetilo (figura 13). Además de encontrarse ligados por enlaces glicosídicos a oligosacáridos, glicolípidos y glicoproteínas, los ácidos siálicos también pueden encontrarse como monosacáridos libres a bajas concentraciones en los líquidos biológicos, como es el caso de la leche.

Al estar formando parte de la fracción glicánica de los glicoconjugados (denominándose entonces sialoglicoconjugados), contribuyen a la ramificada diversidad química de estas estructuras en la superficie celular. La peculiaridad de

estos ácidos siálicos reside en su carga negativa, que en la mayoría de los casos, es la clave de su relevancia funcional. A esto se añade, la importancia que les confiere su localización, ocupando posiciones terminales de las macromoléculas y membranas celulares (Schauer, 2000).

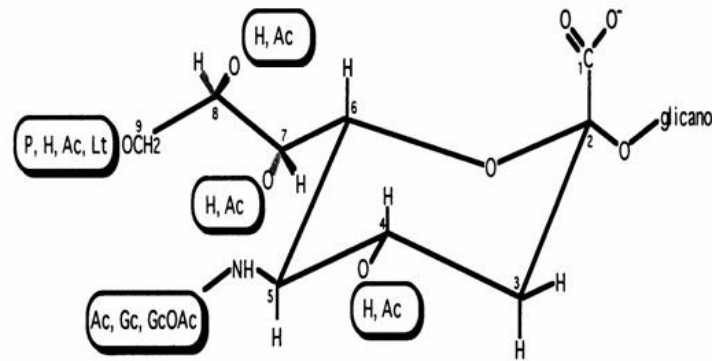


Figura 13. Conformación de los ácidos *N*-acil neuramínicos. Posibles sustituciones: Ac, acetilo; Gc, glicolilo; Lt, lactoilo; Me, metilo; S, sulfato; P, fosfato.

Los ácidos siálicos pueden desempeñar dos funciones básicas: pueden actuar como una máscara para prevenir el reconocimiento biológico, o bien, pueden presentarse como ligandos específicos para la interacción con otras moléculas. El efecto máscara puede ser de tipo general, como ocurre en el caso del feto humano, rodeado por una densa capa de ácidos siálicos que lo protegen del ataque por parte de las células inmunes de la madre. También puede ser un efecto más específico para proteger a las células de ataques por microorganismos y virus (figura 14).

En su papel como ligandos específicos, se conoce un amplio espectro de lectinas y algunos anticuerpos que son capaces de reconocer secuencias oligosacáridicas en las que el ácido siálico es imprescindible. Además son muchas las interacciones huésped-microorganismo que dependen del reconocimiento de ligandos sialilados, entre los que destacan la unión de *Helicobacter pylori* a mucinas gástricas, la unión de toxinas bacterianas a células de mamíferos, o el reconocimiento de eritrocitos por *Plasmodium falciparum* (Varki, 1997).

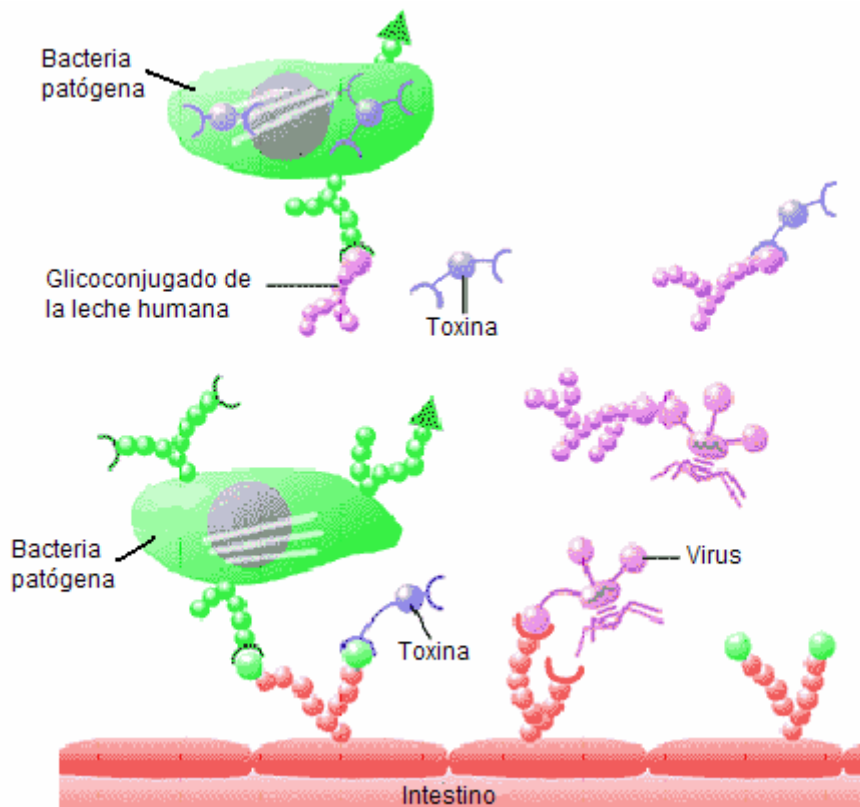


Figura 14. Esquema representativo de las posibles funciones de los glicoconjugados, tanto de la mucosa intestinal como de la leche, en lo que a reconocimiento de bacterias, toxinas y virus se refiere.

La función de los ácidos siálicos en la leche no está muy clara. Se ha sugerido que un aporte exógeno de ácidos siálicos puede ser ventajoso para el lactante, sobre todo en aquellas especies que nacen en un estado de inmadurez elevado. Ésto sería debido a la incapacidad del neonato para sintetizar los ácidos siálicos que necesita para su desarrollo. De hecho, en los primeros días de vida de las ratas y cobayas, se han detectado niveles de actividad muy bajos en enzimas que, como la *N*-acetilglucosamina 2-epimerasa, están implicadas en la biosíntesis de los ácidos siálicos (*Dickson and Messer, 1978; Gal et al., 1997*).

Aunque se han encontrado pequeñas cantidades en tumores humanos y meconio fetal, se presupone que el NeuGc está ausente en los tejidos humanos sanos, y se ha observado que los humanos generan respuestas inmunes contra moléculas administradas que contengan NeuGc. La mayoría de los humanos normales tienen anticuerpos anti-NeuGc circulantes.

El NeuGc se genera por hidroxilación del CMP-NeuAc a CMP-NeuGc. Esta reacción está catalizada por la CMP-NeuAc hidroxilasa (CMAH).

En los humanos existiría una mutación, ocurrida hace 2.5-3 millones de años, que supuso la inactivación del gen CMAH (*Tangvoranuntakul et al.*, 2003).

1.6. OLIGOSACÁRIDOS

No existen apenas datos en la bibliografía acerca del contenido de oligosacáridos de la leche de oveja aunque en calostro se ha descrito (*Urashima et al.*, 2001) la presencia de seis oligosacáridos, tres neutros (galactosillactosas) y tres sialilados (tabla 8). Estos sialiloligosacáridos contienen tanto NeuAc como NeuGc, pero al contrario de lo que ocurre con el calostro de vaca, el calostro ovino contiene más NeuGc que NeuAc. Estas diferencias pueden ser debidas a la diferente actividad de la CMP-NeuAc hidroxilasa de la glándula mamaria de estas especies (*Urashima et al.*, 2001).

Tabla 8. Oligosacáridos del calostro ovino.

| Oligosacáridos del calostro ovino | |
|--|--------------------------------|
| Neutros | α 3'-galactosillactosa |
| | β 3'-galactosillactosa |
| | β 6'-galactosillactosa |
| Ácidos | 3'-N-acetilneuraminillactosa |
| | 3'-N-glicolilneuraminillactosa |
| | 6'-N-glicolilneuraminillactosa |

Además se comprobó la presencia en el calostro ovino de una forma lactonizada de sialillactosa. Estas formas poco abundantes de oligosacáridos podrían tener una cierta importancia en algunos procesos celulares. Así, el virus de la gripe infecta los bronquios o el intestino mediante hemaglutininas que se unen a los sialiloligosacáridos que forman parte de los glicoconjugados presentes en la superficie celular. Los sialiloligosacáridos libres ingeridos con el calostro deberían inhibir el ataque de este virus a la mucosa intestinal, pero cuando sus ácidos siálicos se liberan por acción de la neuraminidasa del virus, los productos resultantes no sialilados no son capaces de unirse a la hemaglutinina del virus. Sin embargo, la sialillactosa en forma de lactona

podría ser más resistente a la acción de la neuraminidasa vírica, y sí se uniría a la hemaglutinina, evitando que ésta se una a la mucosa intestinal (*Suzuki et al.*, 1992).

Normalmente, la lactosa de la leche es hidrolizada por la lactasa de las células de la mucosa intestinal. Los productos resultantes (glucosa y galactosa) se transportan al interior del enterocito y pasan a la circulación sanguínea. Sin embargo, incluso los oligosacáridos más simples como fucosillactosa o sialillactosa, no pueden ser digeridos por la lactasa, necesitan enzimas específicas (α -fucosidasa y neuraminidasa) que no están presentes en las células de la mucosa del intestino delgado (*Engfer et al.*, 2000).

Algunos de estos oligosacáridos se absorben intactos, quizás por endocitosis mediada por receptor (*Gnoth et al.*, 2001), y se excretan por la orina. La mayor parte de ellos, pasan por el intestino delgado sin sufrir modificaciones y llegan al colon, donde pueden ser fermentados por la flora microbiana (*Newburg*, 2000). Hay evidencias de que en algunas especies, los oligosacáridos de la leche pasan al interior de los enterocitos por pinocitosis, y es entonces cuando son hidrolizados por enzimas lisosómicas, produciendo monosacáridos libres.

En el caso de la leche humana, se piensa que el elevado contenido de oligosacáridos se debe a que existe una gran concentración de lactosa que serviría como aceptor para varias de las glicosiltransferasas solubles presentes en la leche (*Urashima et al.*, 2001).

En algunas especies en las que los oligosacáridos suponen un porcentaje importante de los sólidos totales de la leche, tendrían importancia como fuente de energía. *Kunz et al.* (1999) sugirieron que la galactosa y los ácidos siálicos presentes en los oligosacáridos de la leche podrían ser necesarios para el desarrollo óptimo del cerebro de los neonatos en aquellas especies en las que el sistema nervioso central no está completamente desarrollado en el momento del nacimiento.

También es importante destacar el hecho de que la presión osmótica debida a los oligosacáridos disueltos en la leche es menor que la debida a la misma cantidad de lactosa. Esto permite que la leche contenga una mayor concentración de glúcidos y electrolitos, sin llegar a ser hiperosmótica.

En neonatos humanos, la función principal de los oligosacáridos de la leche es más protectora que nutricional (*Newburg*, 2000).

A la vista de lo expuesto anteriormente, los oligosacáridos podrían tener dos funciones diferenciadas:

1- Receptores solubles para bacterias y virus.

Los oligosacáridos podrían mimetizar receptores epiteliales para microorganismos patógenos, actuando así como protectores potenciales de la mucosa intestinal (*Newburg et al.*, 2005). Podrían constituir un mecanismo de defensa adicional para los recién nacidos, cuyo pH gástrico es menos ácido que en los adultos y cuyo sistema inmunitario no es todavía maduro (*Martínez-Ferez et al.*, 2006). Los oligosacáridos pueden inhibir la adhesión de microorganismos patógenos al tracto intestinal y urinario actuando como receptores análogos o falsos receptores, y previniendo por lo tanto infecciones gástricas y urinarias. Por ejemplo, el trisacárido Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc de la leche de oveja es capaz de inhibir la unión de la toxina A de *Clostridium difficile* a la mucosa intestinal de las crías (*Urashima et al.*, 1989). A su vez, los glicolípidos con la secuencia Neu5Gc(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc son receptores de *E. coli* K99, causante de diarrea. Este trisacárido libre, presente en el calostro bovino y ovino, podría ser un inhibidor de la unión de estos patógenos a la mucosa intestinal de terneros y corderos recién nacidos (*Urashima et al.*, 2001).

De hecho, parece que hay menor incidencia de diarreas, enfermedades respiratorias, otitis, y en general enfermedades infecciosas en los neonatos alimentados con leche materna que en los alimentados con fórmulas infantiles (*Martínez-Ferez et al.*, 2006).

2- Factores de crecimiento para la flora intestinal.

Los oligosacáridos presentes en la leche también pueden actuar como prebióticos, promoviendo el crecimiento de microorganismos beneficiosos, como *Bifidobacterium bifidum*, en el tracto gastrointestinal, inhibiendo así la proliferación de organismos patógenos (*Kunz and Rudloff*, 2006). La predominancia de *Bifidobacterium bifidum* en la flora intestinal de neonatos alimentados con leche materna llevó a Moro en 1900 a concluir que la leche humana contenía un factor de crecimiento para estos microorganismos. *György et al.* (1954) encontraron que la ginolactosa, una mezcla de unos 10 oligosacáridos, era el factor promotor del crecimiento de *bifidus*. Posteriormente se demostró que eran los oligosacáridos que contenían *N*-acetilglucosamina en su molécula los que actuaban como factores de crecimiento para esta especie (*Kunz and Rudloff*, 1993).

1.7. ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, clasificado dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae* que fue descubierto en 1885 por Theodor Escherich quien lo denominó inicialmente *Bacterium coli* (Blanco and Blanco, 1993). Esta familia es muy heterogénea y comprende gran número de géneros y especies. El género tipo es *Escherichia* y la especie tipo, *Escherichia coli* (tabla 9).

Tabla 9. Clasificación de las Enterobacterias.

| Clasificación de las enterobacterias | |
|--------------------------------------|------------------------------|
| Dominio | <i>Bacteria (Eubacteria)</i> |
| Reino | <i>Proteobacteria</i> |
| Sección | <i>γ Proteobacterias</i> |
| Orden | <i>Enterobacteriales</i> |
| Familia | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Género tipo | <i>Escherichia</i> |
| Especie tipo | <i>Escherichia coli</i> |

Los miembros de esta familia se suelen denominar enterobacterias o bacterias entéricas y se hallan ampliamente distribuidas en el agua, la tierra, las plantas y muy especialmente en el tracto intestinal del hombre y de los animales formando parte de la micropoblación bacteriana normal del intestino grueso (Blanco *et al.*, 2002). Además de ser un habitante común del tracto intestinal de humanos y de varios animales, *Escherichia coli* es también un importante agente etiológico, causante de patologías tanto intestinales como extraintestinales (De Graaf and Mooi, 1986).

En 1947, Kauffmann propuso una forma de diferenciar *E. coli* en base a la determinación de varios antígenos superficiales (serotipificación) (figura 15):

- Antígeno O (somático): es un polisacárido termoestable (estable tras calentarlo a 121° C/2 h) que forma parte del lipopolisacárido presente en la membrana externa de la pared celular.

- Antígeno K (capsular): se corresponde con el polisacárido capsular que envuelve la pared celular y enmascara el antígeno O.

- Antígeno H (flagelar): es de naturaleza proteica y termolábil, de forma que se inactiva por calentamiento a 100° C/30 min (Blanco *et al.*, 2002).

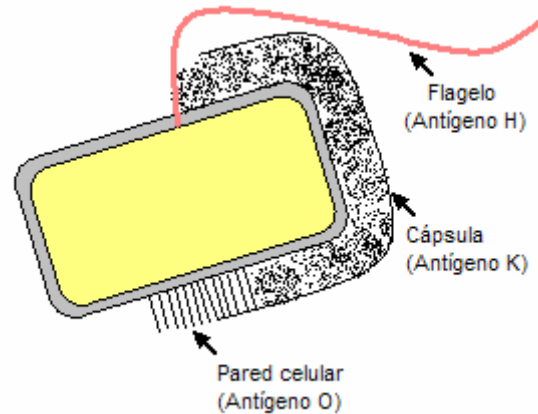


Figura 15. Esquema de la bacteria *Escherichia coli* en el que se representan varios antígenos de superficie (O, K y H).

Aunque existen numerosas combinaciones o serotipos O:K:H, tan solo algunos son frecuentes entre las cepas patógenas. Algunas de estas cepas patógenas pueden producir infecciones entéricas (diarreas, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico/hemolítico y enfermedad de los edemas) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis e infecciones pulmonares y de heridas).

E. coli provoca entre los seres humanos millones de casos de diarrea en el mundo y muchas muertes, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo. Además es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado a infecciones urinarias y septicemias en el ser humano. En los animales domésticos las colibacilosis son muy frecuentes, afectando esencialmente a animales de pocos días de edad y recién destetados y ocasionan importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino y ovino, así como en la cría intensiva de aves y conejos. Mientras que en terneros, lechones, corderos y gazapos *E. coli* suele producir diarrea, en aves provocan fundamentalmente infecciones respiratorias y septicemias (Blanco *et al.*, 2002).

Las cepas de *E. coli* patógenas se han englobado en diferentes grupos o categorías:

- *E. coli* enteropatógenas (EPEC)
- *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC)
- *E. coli* enteroinvasivas (EIEC)
- *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) o enterohemorrágicas (EHEC)
- *E. coli* enteroagregativas (EAEC)

- *E. coli* con adherencia difusa (ADEC)
- *E. coli* uropatogénicas (UPEC)
- *E. coli* bacteriémicas o septicémicas

Las cepas de estos grupos presentan mecanismos de patogénesis específicos, se corresponden con serotipos distintos y producen infecciones y síndromes diferentes.

Por ser de especial interés para nuestro trabajo, nos centraremos en dos de estos grupos, las ETEC patógenas de terneros y UPEC patógenas humanas.

1.7.1. *E. coli* ENTEROTOXIGÉNICAS PATÓGENAS DE TERNEROS

En todas las cepas patógenas son varios los factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad. Así, las cepas enterotoxigénicas, para poder causar diarrea, además de secretar enterotoxinas responsables de la deshidratación, poseen factores de colonización que les permiten adherirse a los enterocitos y colonizar el epitelio intestinal. Sin estos factores, las bacterias enterotoxigénicas serían eliminadas mecánicamente por los movimientos peristálticos del intestino delgado, y no podrían producir diarrea a pesar de producir enterotoxinas.

La adherencia de *E. coli* se debe a la presencia de unos filamentos proteicos que se proyectan a lo largo de toda la superficie de las bacterias y que reciben el nombre de fimbrias o pilus. Estos filamentos son estructuras fímbricas rígidas (de 5 a 7 nm de diámetro) o flexibles (de 2 a 3 nm) que están constituidas por unas 1000 subunidades estructurales repetidas, y unas pocas (menos de 10) subunidades menores funcionales, entre las que se encuentran las responsables de la adhesión, que se sitúan en la punta de la fimbria, y que se denominan adhesinas (*Blanco et al.*, 2002). La información genética para la síntesis de estas adhesinas o factores de colonización se localiza normalmente en plásmidos que suelen codificar también para la síntesis de enterotoxinas.

Entre las adhesinas de *E. coli* se observó que algunas de ellas conferían a la bacteria la capacidad de adherirse a eritrocitos o a otras células provocando su aglutinación; pero además, también se observó que en algunos casos la presencia de manosa libre bloqueaba dicha adhesión. A este tipo de adherencia se la denominó

sensible a la manosa (MS). Sin embargo, otras cepas de *E. coli* poseen un tipo de adhesión que no se ve inhibida por la manosa, en cuyo caso el receptor celular de la adhesina estaría compuesto por otro glúcido distinto a la manosa. A este segundo tipo de adherencia se la denominó resistente a la manosa (MR) (*Blanco and Blanco, 1993*).

Las fimbrias tipo 1 son agregados proteicos formados por un solo tipo de subunidad repetida varias veces de un peso molecular de 17.000. La mayoría de las cepas de *E. coli*, tanto comensales como patógenas, producen este tipo de fimbrias y confieren a las bacterias la capacidad de atacar a una gran diversidad de animales, plantas, hongos y levaduras, por lo que es considerado un factor de colonización a nivel general. Este tipo de fimbria es sensible a manosa.

Además de las fimbrias tipo 1, la mayoría de las cepas patógenas de *E. coli* producen otra serie de fimbrias más específicas, que se caracterizan por ser resistentes a la manosa. A continuación se describen algunas de ellas, presentes en las cepas enterotoxigénicas de *E. coli* utilizadas en nuestro estudio:

- Fimbrias K99: la adhesina K99 es de naturaleza proteica, forma parte de estructuras fibrilares de 4.8 nm de diámetro y son capaces de adherirse al epitelio intestinal y de aglutinar eritrocitos de determinadas especies en presencia de manosa. En la síntesis y posterior ensamblaje de las fimbrias K99 se encuentran implicados 7 polipéptidos con diferentes pesos moleculares. La naturaleza de los receptores celulares del antígeno K99 todavía no es conocida claramente, si bien existen datos que apuntan a que dichos receptores pueden estar constituidos por glicolípidos o gangliósidos. También se ha comprobado que el antígeno K99, al igual que F41, se une a glicanos de glicoproteínas del calostro bovino y porcino (*Blanco and Blanco, 1993*). Parece que las fimbrias K99 tienen una afinidad preferente por derivados del ácido neuramínico, como el ácido *N*-acetilneuramínico y especialmente por el ácido *N*-glicolilneuramínico (*Seignole et al., 1991*).

- Fimbrias F41: es una fibrilla de 2.3 nm de diámetro que hemaglutina, de forma resistente a la manosa, eritrocitos de varias especies. Los genes que codifican para F41 se han localizado en el cromosoma. El antígeno F41 se expresa frecuentemente junto a K99 en cepas ETEC porcinas, bovinas y ovinas de determinados serogrupos. No obstante, también se han aislado cepas que expresan únicamente F41.

- Fimbrias Att25: algunos ETEC bovinos además de K99 pueden expresar otra adhesina conocida como Att25 o FY, que ha sido clasificada como F17. Es una adhesina de estructura fibrilar de 3 a 4 nm de diámetro que está constituida por subunidades proteicas de 20000 Da. Se cree que tanto esta adhesina, como la F41, pueden contribuir a aumentar el poder de colonización de los ETEC bovinos con K99 (*Blanco and Blanco, 1993*).

Otro factor de virulencia importante en estas cepas son las toxinas. Las cepas bovinas sintetizan dos tipos diferentes:

- Enterotoxina termolábil (LT): es una proteína de elevado peso molecular (85000 Da) constituida por una subunidad A y cinco subunidades B.

- Enterotoxinas termoestables (STa y STb): son pequeños polipéptidos de 1900 a 5000 Da.

Las enterotoxinas actúan incrementando la concentración de monofosfato cíclico de adenosina o guanosina en los enterocitos, lo que provoca una importante salida de agua y electrolitos a la luz intestinal (*Blanco et al., 2002*).

1.7.2. *E. coli* UROPATOGÉNICAS HUMANAS

Son la causa del 90% de las infecciones del tracto urinario (UTI) en todo el mundo, incluyendo cistitis y pielonefritis (*Hoonton and Stamm, 1997*). Las UPEC colonizan el tracto urinario tras ascender a la vejiga procedentes de la región perineal o de las heces (*Kuhar et al., 1998*). Mientras otras mucosas están directamente accesibles a los patógenos, el tracto urinario es más cerrado, se encuentra normalmente estéril y bien protegido por mecanismos de resistencia (*Schaeffer et al., 2001*) que incluyen fuerzas hidrocinéticas, constante exfoliación del epitelio, factores antimicrobianos, etc. El microorganismo colonizador debe ser muy eficaz salvando estas barreras para que la colonización sea exitosa, de ahí la importancia de la adhesión. Las UPEC codifican información para toda una serie de factores de virulencia que les permiten colonizar y persistir en el tracto urinario, entre los que se encuentran toxinas (como la hemolisina o el factor necrotizante citotóxico), el sideróforo aerobactina, cápsulas, lipopolisacáridos, y toda una serie de orgánulos adhesivos (*Mulvey et al., 2000*). Una vez colonizado el tracto urinario la UPEC puede replicarse o permanecer en un estado quiescente en reservorios para infecciones recurrentes (*Blanco et al., 1997*). El intestino delgado o el tejido periuretral constituyen dos de estos reservorios de UPEC.

Son varias las adhesinas características de las UPEC: P, F (también llamada P-like), S y Afa (Johnson, 1991). Además de éstas, también expresan las fimbrias tipo 1 vistas anteriormente.

Las adhesinas mejor caracterizadas de las UPEC son la fimbria P y la fimbria tipo 1. La fimbria P recibe este nombre por su capacidad de unirse específicamente al antígeno del grupo sanguíneo P, que contiene un residuo de Gal(α 1-4)Gal (Johnson, 1991). Este disacárido está también presente en la serie globo de los glicolípidos de la superficie de las células uroepiteliales del 99% de la población, y parece demostrado que actúa como receptor de las fimbrias P a nivel uroepitelial (Strömberg *et al.*, 1990). De hecho la presencia o ausencia de este determinante antigénico en un individuo puede condicionar su susceptibilidad a padecer UTI (Schaeffer *et al.*, 2001). Las fimbrias P y las fimbrias P-like (F) están muy relacionadas pero al estar codificadas por diferentes genes, tienen distintos receptores. Se ha sugerido que las fimbrias P-like podrían reconocer una estructura relacionada con el antígeno de Forssman (GalNAc-GalNAc) (Johanson *et al.*, 1993), pero no se ha descartado que puedan reconocer otras secuencias (Hacker, 1992). Por su parte, las fimbrias S expresadas por *E. coli* causantes de sepsis y meningitis, pero también presentes en UPEC en recién nacidos, se unen a carbohidratos que contengan la secuencia sialil(α 2-3)galactósido (Schroten *et al.*, 1998). La menor relevancia de estas fimbrias en las UTI se debe a que la orina posee inhibidores de su unión (Johnson, 1994).

1.7.3. LA HEMAGLUTINACIÓN COMO MODELO DE ADHESIÓN BACTERIANA

La hemaglutinación fue la primera manifestación observada de las propiedades adhesivas de las bacterias. La mayoría de las cepas de *E. coli* posee esta actividad. Duguid *et al.* (1955) mostraron que la capacidad hemaglutinante estaba relacionada con la presencia de fimbrias. Se vio que las cepas de *E. coli* que expresaban la fimbria tipo 1 eran capaces de aglutinar una gran variedad de eritrocitos de diferentes especies animales, aunque con diferente intensidad.

En la mayoría de cepas de *E. coli*, la actividad hemaglutinante era inhibida por D-manosa, lo cual indicaba la presencia de fimbrias tipo 1. Sin embargo, cuando se utilizaban cepas patógenas de *E. coli*, portadoras de fimbrias específicas, sí ocurría la aglutinación de eritrocitos, de una forma no sensible a manosa. Este tipo de hemaglutinación, que se llamó resistente a manosa, se observaba cuando las cepas eran crecidas a 37° C, pero no a 18° C.

La mayoría de las cepas producen fimbrias tipo 1, pero también otras fimbrias resistentes a manosa. Por lo tanto, una cepa puede producir distintos tipos de hemaglutinación.

Aunque la aglutinación de eritrocitos está generalmente aceptada como una indicación de la presencia de adhesinas bacterianas, no se puede decir que los componentes celulares presentes en las membranas de los eritrocitos, reconocidos por las adhesinas bacterianas, sean siempre idénticos al receptor natural de *E. coli* en la célula epitelial hospedadora.

Obviamente, la adherencia de bacterias a células eucariotas es un fenómeno muy complejo, que no depende sólo del tipo de adhesinas expresadas por una cepa particular bajo unas condiciones de cultivo determinadas, sino también de la gran variedad de estructuras receptoras diferentes que existen en las células eucariotas (*De Graaf and Mooi, 1986*).

1.8. OBJETIVOS

La leche es un componente fundamental de la alimentación de los mamíferos durante los primeros meses de vida, ya que contiene los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo del recién nacido (proteínas, grasa, carbohidratos, etc.). Además presenta una serie de compuestos que podrían participar en la defensa del neonato frente a infecciones, entre los que se encuentran los glicoconjugados de los que no se conoce mucho acerca de su función en la leche (Dai et al., 2000; Martín- Sosa et al., 2003). Se ha propuesto su participación en la defensa del recién nacido frente a infecciones en los primeros días de vida, cuando el sistema inmune no está aun completamente desarrollado, actuando como falsos receptores solubles de bacterias y/o sus toxinas en el tubo digestivo bloqueando su unión a las células de la mucosa intestinal (Newburg, 1999).

La leche de vaca, debido a su utilización como alimento para los humanos, es un alimento caro para el ternero. En las explotaciones ganaderas, se alimenta a los terneros recién nacidos durante uno o dos días con calostro para que reciban una transferencia pasiva de inmunidad procedente de su madres, para pasar a continuación a ser alimentados con sustitutivos de la leche (lactorreemplazantes (LR)) (Heinrichs et al., 1995). Los LR existentes en el mercado han sido elaborados considerando, fundamentalmente, criterios económicos para abaratar el coste de la cría de los terneros, por lo que no se han tenido en cuenta compuestos poco abundantes en la leche como los glicoconjugados entre otros (Nollet et al., 1999).

La leche de oveja es también un producto de alto valor debido a que se utiliza para la fabricación de quesos con un elevado precio en el mercado. Se caracteriza por presentar un contenido de sólidos totales, proteínas y grasa muy altos en comparación con la leche de vaca o cabra.

Teniendo en cuenta lo anterior, nos pareció interesante llevar a cabo un estudio de ciertos aspectos de la composición de la leche de oveja, como son los sialoglicoconjugados, pero también glicoesfingolípidos neutros y fosfolípidos y de su contenido de ácidos grasos. Además, hemos tratado de profundizar en el estudio de su posible función en la leche. Por otro lado, existen subproductos de la leche de oveja obtenidos en la fabricación de quesos que son empleados en la producción de LR para la alimentación de terneros. Un conocimiento exhaustivo de estos aspectos de la composición de la leche de oveja permitiría llevar a cabo una formulación/suplementación de los LR basada en los datos experimentales obtenidos.

Siguiendo la línea de investigación de nuestro grupo, que pretende conocer más a fondo la estructura y función de determinados componentes de la leche, como los gangliósidos y otros glicoconjugados, los objetivos concretos que se proponen son:

→ Determinación de la distribución de los sialoglicoconjugados (oligosacáridos, glicoproteínas y caseína) de la leche de oveja y la presencia de NeuGc en estas fracciones.

→ Estudio de la distribución individual de gangliósidos, glicolípidos neutros y fosfolípidos y su contenido en ácidos grasos.

→ Estudio de la capacidad de adhesión de algunos de estos glicoconjugados a bacterias patógenas (cepas enterotoxigénicas de E. coli) para el ternero.

2

Materiales y Técnicas

- 2.1. APARATOS
- 2.2. PRODUCTOS
- 2.3. LAS MUESTRAS DE LECHE
- 2.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA
- 2.5. SIALOGLICOCONJUGADOS
 - 2.5.1. Obtención de las diferentes fracciones de sialoglicoconjugados
 - 2.5.2. Determinación del contenido de ácidos siálicos en cada fracción
 - 2.5.3. Separación, identificación y cuantificación de los diferentes tipos de ácidos siálicos
- 2.6. GANGLIÓSIDOS
 - 2.6.1. Obtención de gangliósidos
 - 2.6.2. Purificación de gangliósidos
 - 2.6.3. Determinación del contenido de gangliósidos individuales
- 2.7. GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS
 - 2.7.1. Obtención y purificación de glicoesfingolípidos neutros
 - 2.7.2. Determinación del contenido de glicoesfingolípidos neutros
 - 2.7.3. Determinación del contenido de ácidos grasos
- 2.8. FOSFOLÍPIDOS
 - 2.8.1. Obtención de fosfolípidos
 - 2.8.2. Determinación del contenido de fosfolípidos
 - 2.8.3. Determinación del contenido de ácidos siálicos de los fosfolípidos totales e individuales
- 2.9. OLIGOSACÁRIDOS
 - 2.9.1. Obtención de oligosacáridos
 - 2.9.2. Separación e identificación de oligosacáridos
- 2.10. ADHESIONES BACTERIANAS
 - 2.10.1. Ensayos de hemaglutinación
 - 2.10.2. Ensayos de inmunodetección en placa

2.1. APARATOS

- Agitadores magnéticos
- Agitador oscilante
- Autoclaves:
 - *RAYPA*
 - *P-SELECTA*
- Balanzas de precisión *PRECISA* y *SARTORIUS*
- Baños de ultrasonidos:
 - *BRANSON 2210*
 - *ULTRASONIC CLEANER, FUNGILAB*
- Baños termostatados *SBS*
- Bomba de vacío *LABOPORT KNF*
- Bombona de nitrógeno
- Calefactor de tubos *TERMOBLOC, LIEBISCH*
- Cámara fría a 4° C
- Campanas de extracción de gases
- Centrífugas:
 - *BECKMAN COULTER "Allegra 21R"*
 - *BECKMAN TJ-6(R)*
 - *P-SELECTA*
- Congeladores de -20° C y de -80° C *THERMO*
- Densitómetro *SHIMADZU CS-9000*
- Destilador de vidrio para solventes orgánicos
- Embudos de vidrio poroso
- Equipo de purificación de agua *MILLIPORE* (Filtros *Milli-Ro*[®] y *Milli-Q*[®]).
- Espectrofotómetro *LKB BIOCHROM NOVACPEC II*
- Estufa
- Filtros de acetato de celulosa *CHROMAFIL CA-45125*
- Incubador estático *HERAEUS*
- Homogeneizador *POLYTRON PCU*
- Liofilizadores:
 - *FLEXI-DRY FTS SYSTEMS INC.*
 - *TELSTAR CRYODOS 50*

- Material de cromatografía:
 - Cubetas de diferentes volúmenes
 - Revelador de vidrio *CAMAG*
 - Columnas de vidrio de diferentes tamaños
- Micropipetas *GILSON* de diferentes volúmenes
- Multipipeta de repetición *EPPENDORF*
- pHímetro *CRISON*, micro pH 2001
- Placa calefactora *TLC PLATE HEATER III, CAMAG*
- Rotavapor *R BÜCHI (R200)*
- Termosellador
- Material de uso corriente en un laboratorio de bioquímica

2.2. PRODUCTOS

- Acetato de butilo, *Panreac*
- Acetato sódico, *PROBUS*
- Acetona*
- Ácido acético glacial, *Panreac*
- Ácido ascórbico, *Panreac*
- Ácido clorhídrico, *Panreac*
- Ácido cítrico, *PROBUS*
- Ácido fórmico, *Panreac*
- Ácido *N*-acetilneuramínico, *SIGMA*
- Ácido *N*-glicolilneuramínico, *SIGMA*
- Ácido perclórico, *PROBUS*
- Ácido peryódico, *SCARLAU (FEROSA)*
- Ácido silícico, *MERCK*
- Ácido sulfúrico, *Panreac*
- Ácido tiobarbitúrico, *SIGMA*
- Ácido tricloroacético, *Panreac*
- Adenina, *SIGMA*
- Agar, *Bactoagar Becton Dickinson*
- Agua destilada Milli-Ro[®]
- Agua ultrapura Milli-Q[®]
- Amoníaco, *PROBUS*
- Anticuerpo conjugado biotinilado anti-inmunoglobulinas de ratón, *SIGMA*
- Anticuerpo conjugado biotinilado anti-inmunoglobulinas de conejo, *SIGMA*
- Arsenito sódico, *PROBUS*
- BF3-Metanol, *SIGMA*
- *n*-Butanol, *Panreac*
- Casaminoácidos, *DIFCO*
- Citrato sódico, *PROBUS*
- Cloroformo*
- Cloruro sódico, *Panreac*
- Cloruro cálcico, *Panreac*
- Cloruro potásico, *PROBUS*
- Columna de Sephadex (HiPrep 26/10 Deslting)
- Columnas Sep Pak C18, *WATERS*
- Dowex 2x8, *SIGMA*
- Extracto de levadura, *GIBCO*
- Estreptavidina-fosfatasa alcalina, *SIGMA*
- Etanol, *Panreac*
- Éter dietílico, *Panreac*
- Éter de petróleo, *Panreac*
- FAST-BCIP, *SIGMA*
- Formiato sódico, *Panreac*
- Fosfato disódico, *Panreac*
- Fosfato monosódico, *PROBUS*
- Hexano, *MERCK*
- Glucosa, *PROBUS*
- Hidróxido sódico, *Panreac*
- Isooctano, *MERCK*
- Isovitale X, *Becton Dickinson*
- D-Manosa, *SIGMA*
- Medio Mueller-Hinton, *DIFCO*
- Membranas de diálisis *VISKING, MEDICELL INTERNATIONAL LTD*
- Metanol*
- Metanol/HCl 0.5 N, *Supelco*
- Molibdato amónico, *PROBUS*
- Orcinol, *SIGMA*
- Patrones de fosfolípidos, *SIGMA*
- Patrones de glicolípidos neutros, *SIGMA* y *Larodan*
- Patrones de gangliósidos de cerebro bovino obtenidos en nuestro laboratorio
- Phospray, *Supelco*

- Placas de HPTLC de Silicagel 60, aluminio, *MERCK*
- Placas de HPTLC de Silicagel 60, vidrio, *MERCK*
- Placas de TLC de Silicagel 60, vidrio, *MERCK*
- Placas multipocillo con fondo en V, *NUNC*
- Placas Petri, *JLC*
- Poli-isobutilmetacrilato, *Aldrich*
- Propanol, *Panreac*
- Resorcina, *Panreac*
- Seroalbúmina bovina, fracción V, *SIGMA*
- Sulfato cúprico, *PROBUS*
- Taurodeoxicolato, *SIGMA*
- Tris [hidroximetil] aminometano (TRIS), *SIGMA*
- Productos de uso corriente en un laboratorio de bioquímica

*Solventes orgánicos destilados en nuestro laboratorio antes de su utilización

2.3. LAS MUESTRAS DE LECHE

Se utilizaron ovejas procedentes de la Sociedad Cooperativa Ganadera de Lácteos y Derivados (COGALAD) de Valderrodrigo (Salamanca). Los animales pertenecían a las siguientes razas en las proporciones aproximadas que se indican:

- | | |
|--|-----|
| - Assaf y cruces de ésta con otras razas | 90% |
| - Churra | 10% |

Se tomaron varias muestras de leche de gran mezcla en tres fechas distintas: Noviembre de 2002, Octubre de 2005 y Marzo de 2007.

La leche se transportó al laboratorio entre hielo, se congeló y se liofilizó. El liofilizado se mezcló exhaustivamente para asegurar una distribución homogénea de los componentes.

2.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA

Para la obtención de la materia grasa utilizamos el procedimiento descrito en la norma FIL-1A: 1969 de la Federación Internacional de Lechería.

El contenido de materia grasa se determina gravimétricamente, por extracción de la citada materia grasa de una solución alcohólico-amoniaco de la leche liofilizada reconstituida en agua destilada, mediante éter dietílico y éter de petróleo, evaporación de los disolventes y pesado del residuo, según el principio del método de Röse-Gottlieb.

Se partió de 1 g de leche liofilizada que reconstituimos en la cantidad de agua correspondiente a su grado de hidratación inicial. Preparamos la solución alcohólico-amoniaco añadiendo 0.87 ml de amoníaco primero, y 6.5 ml de etanol al 96% después, a 6.5 g de la leche reconstituida. Seguidamente añadimos 16.25 ml de éter dietílico y agitamos durante 5 min. Añadimos entonces 16.25 ml de éter de petróleo y agitamos durante 10 min. Centrifugamos a 1100xg durante 10 min a 4°C. Se obtuvieron dos fases:

- fase superior, orgánica, que contiene la grasa y que recogimos
- fase inferior, en la que se encuentran el resto de compuestos

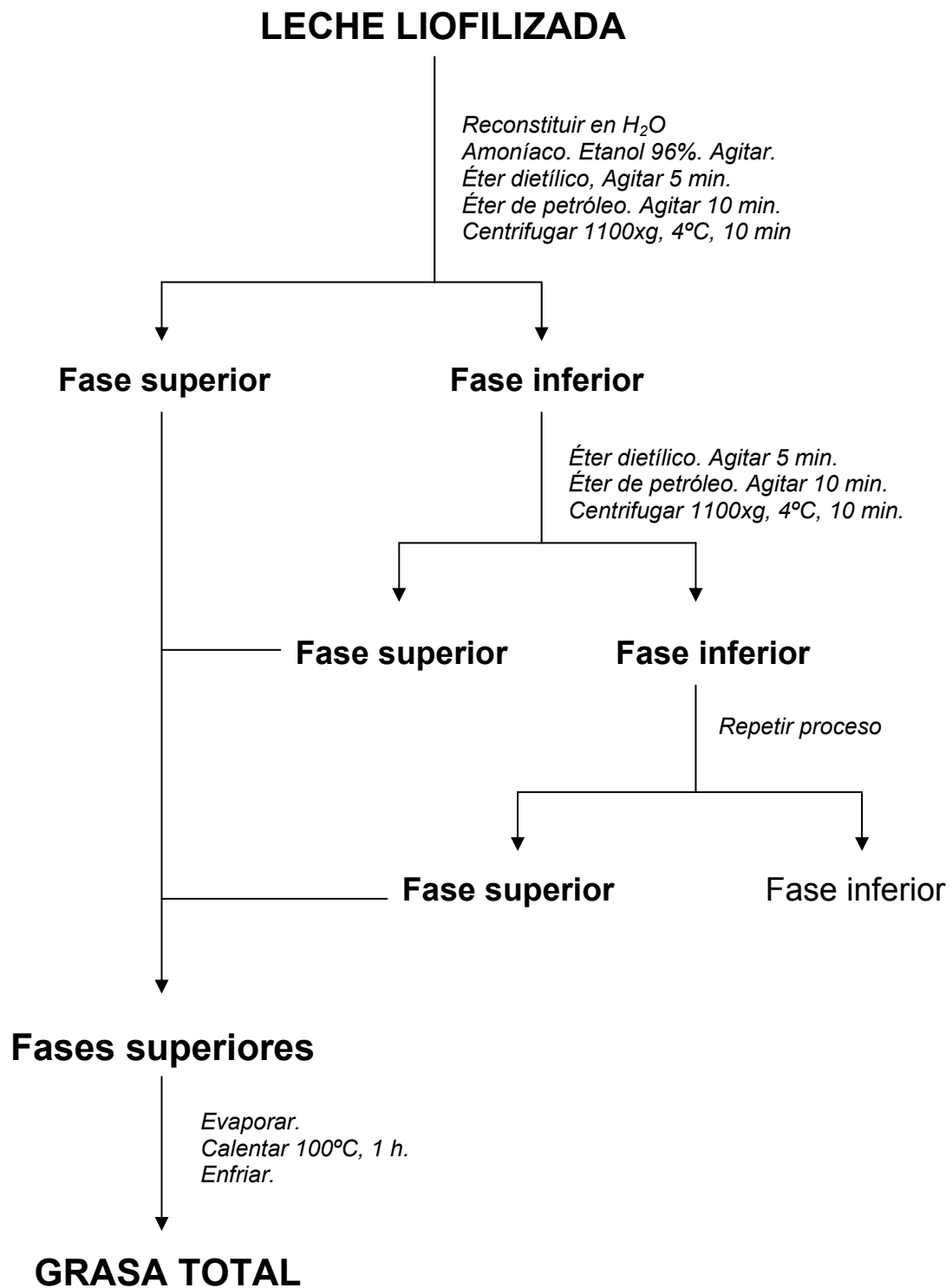


Figura 16. Esquema de la obtención de la grasa total de la leche.

Con la fase inferior llevamos a cabo una segunda extracción. Añadimos 16.25 ml de éter dietílico y agitamos 5 min. Añadimos 9.75 ml de éter de petróleo y agitamos 10 min. Centrifugamos a 1100xg durante 10 min a 4°C. Recogimos la fase superior y con la fase inferior realizamos una tercera extracción repitiendo el proceso llevado a cabo en la segunda. Tras la última centrifugación desechamos la fase inferior, y las fases superiores se evaporaron con el rotavapor. Calentamos el balón durante 1 h a 100°C en estufa. Enfriamos y pesamos. La diferencia de pesada obtenida nos permitió calcular el porcentaje de grasa total (figura 16).

2.5. SIALOGLICOCONJUGADOS

En la leche de oveja están presentes diferentes compuestos que contienen en su molécula uno o varios ácidos siálicos (sialoglicoconjugados). Se estudiaron por tanto las diferentes fracciones de sialoglicoconjugados: oligosacáridos, glicoproteínas, caseínas, ácidos siálicos libres y gangliósidos. Los gangliósidos se estudiarán en un apartado distinto debido a su relevancia.

2.5.1. OBTENCIÓN DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE SIALOGLICOCONJUGADOS

Los ácidos siálicos presentes en la leche de oveja se pueden encontrar de forma libre o unidos a otros compuestos como proteínas, lípidos y oligosacáridos. Para la determinación del contenido de ácidos siálicos de los diferentes sialoglicoconjugados, se valoró dicho contenido en glicoproteínas (ASG), oligosacáridos (ASO) y caseínas (ASC), así como la cantidad de ácidos siálicos totales (AST) y libres (ASL) de las muestras.

2.5.1.1. Glicoproteínas y oligosacáridos

Reconstituimos 0.2 g de liofilizado en 4 ml de agua destilada mediante agitación y baño de ultrasonidos. La leche reconstituida se centrifugó a 3000xg durante 30 min a 4°C. La grasa de la leche, que queda en la parte superior de la muestra formando una capa compacta, se eliminó. El suero de la leche se filtró a través de lana de vidrio para eliminar los restos de la grasa que pudieran quedar (*Martín et al.*, 2001).

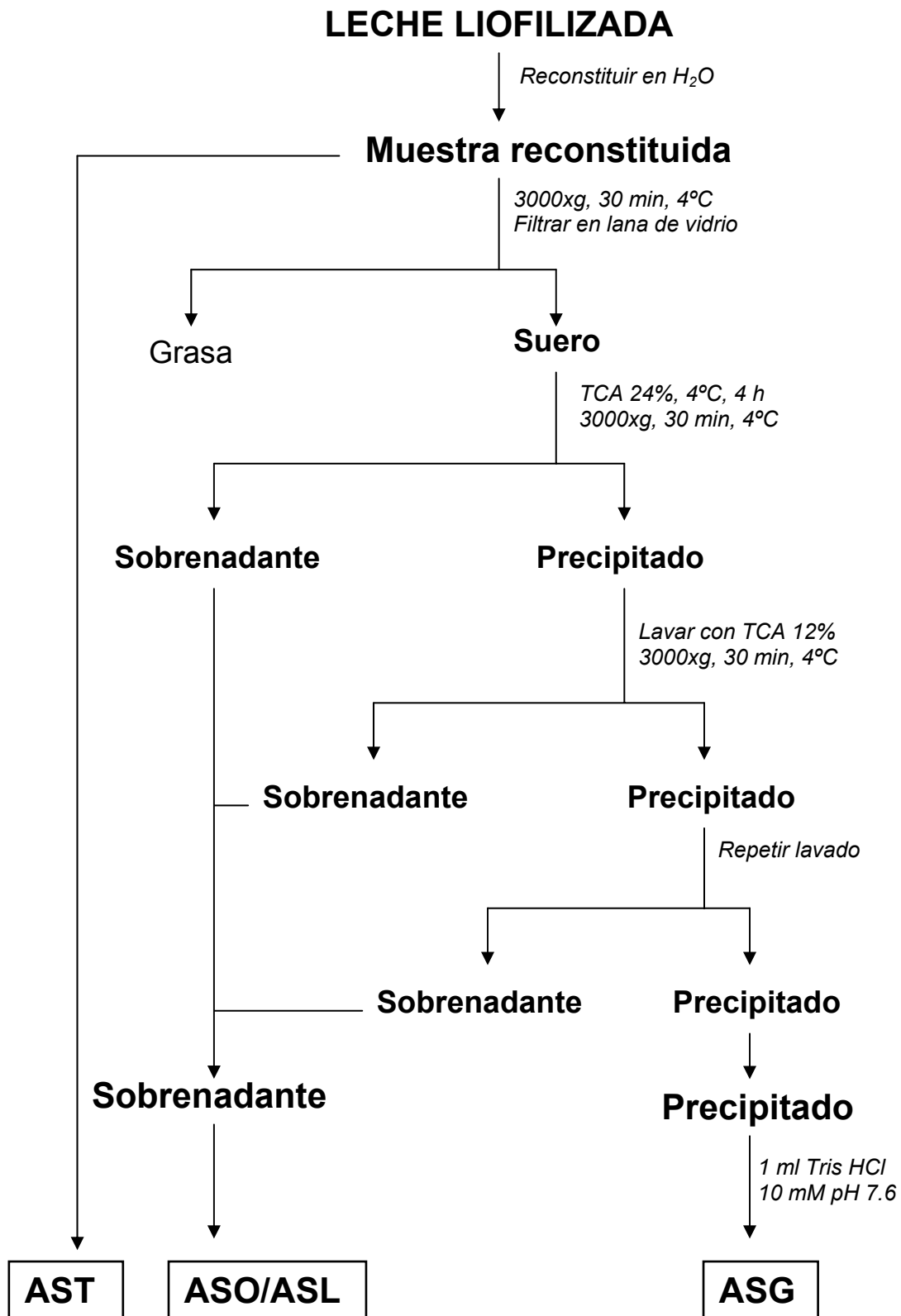


Figura 17. Esquema de la obtención de las distintas fracciones de sialoglicoproteínas.

Al filtrado resultante se le añadió un volumen igual de TCA al 24%, se mantuvo durante 4 h a 4°C para que precipitaran las proteínas y posteriormente se sometió a una centrifugación a 3000xg durante 30 min a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con TCA al 12% centrifugándose a continuación como ya se describió anteriormente, con el fin de extraer los oligosacáridos que quedaron retenidos en la fracción proteica. Finalmente se reunieron los tres sobrenadantes resultantes constituyendo la fracción oligosacáridica que se utilizó para la determinación de los ácidos siálicos unidos a oligosacáridos. El precipitado final, que contiene las glicoproteínas, se resuspendió en 1 ml de Tris HCl 10 mM pH 7.6 mediante agitación y sonicación y se empleó para la determinación de los ácidos siálicos de las glicoproteínas (*Martín et al., 2001*) (figura 17).

2.5.1.2. Caseínas

La obtención de la caseína se lleva a cabo por precipitación isoeléctrica a pH 4.6, consiguiendo así su separación del resto de proteínas de la leche (*López Fandiño et al., 1993*).

Se partió de 0.2 g de liofilizado que se reconstituyeron en 4 ml de agua destilada mediante agitación y baño de ultrasonidos. La leche reconstituida se descremó mediante centrifugación a 3000xg, 30 min a 4°C y posterior filtrado en lana de vidrio. Al filtrado se le añadió ácido acético al 1% hasta pH 4.6, punto en el que se aprecia la formación de un precipitado que corresponde a la fracción de caseínas. Se centrifugó a 4500xg durante 15 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces con 3 ml de tampón acético/acetato sódico 0.1 N, pH 4.6, centrifugándose de nuevo a 4500xg a 4°C, 15 min.

Finalmente el precipitado obtenido se resuspendió en 2 ml de Tris HCl 10 mM pH 7.6, y se utilizó para determinar los ácidos siálicos unidos a la caseína (figura 18).

LECHE LIOFILIZADA

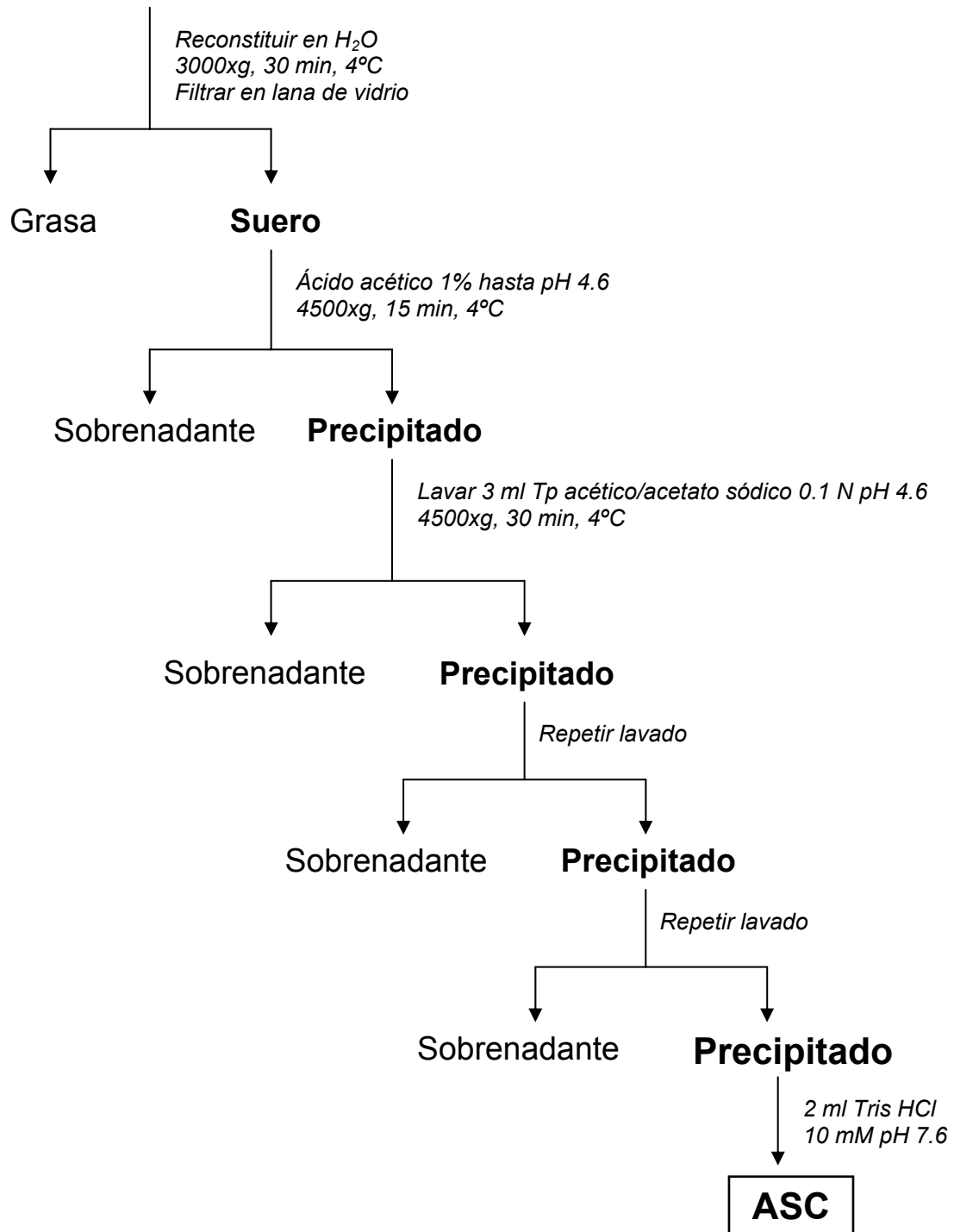


Figura 18. Esquema de la obtención de la fracción de caseínas.

2.5.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS SIÁLICOS EN CADA FRACCIÓN

La determinación del contenido de ácidos siálicos de las fracciones de glicoproteínas, oligosacáridos y caseína se realizó mediante la técnica del resorcinol de *Svennerholm* (1957). También se determinó mediante esta técnica el contenido de ácidos siálicos totales. Los ácidos siálicos libres se cuantificaron mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico (*Aminoff*, 1961).

Para la cuantificación de los ácidos siálicos totales se partió de 0.1 g de liofilizado de la muestra de leche correspondiente, que se reconstituyó en 1 ml de agua destilada mediante agitación y baño de ultrasonidos. Se le añadieron 5 ml de H_2SO_4 0.12N (concentración final de 0.1N) y se mantuvo a 80°C durante una hora.

Tras dejar enfriar la muestra hidrolizada a temperatura ambiente, centrifugamos los tubos durante 10 min a 1100xg obteniéndose un sobrenadante en el que se encuentran todos los ácidos siálicos de la muestra. Pasamos este sobrenadante por una columna de intercambio iónico Dowex 2x8 (en forma de formiato) (*Hueso et al.*, 1988) y lavamos la columna con 20 ml de agua destilada para arrastrar y eliminar todos los compuestos que no quedaron retenidos. Los ácidos siálicos se eluyeron con 20 ml de ácido fórmico 1 N. Este eluato se congeló, se liofilizó y se utilizó para la determinación de los ácidos siálicos totales de la muestra.

Para la determinación de los ácidos siálicos de glicoproteínas, oligosacáridos y caseína se tomó 1 ml de cada una de las fracciones obtenidas según se describió en los apartados 2.5.1.1. y 2.5.1.2. y se sometieron a una hidrólisis ácida (H_2SO_4 0.1 N) y purificación a través de Dowex 2x8 como ya se ha descrito anteriormente (figura 19).

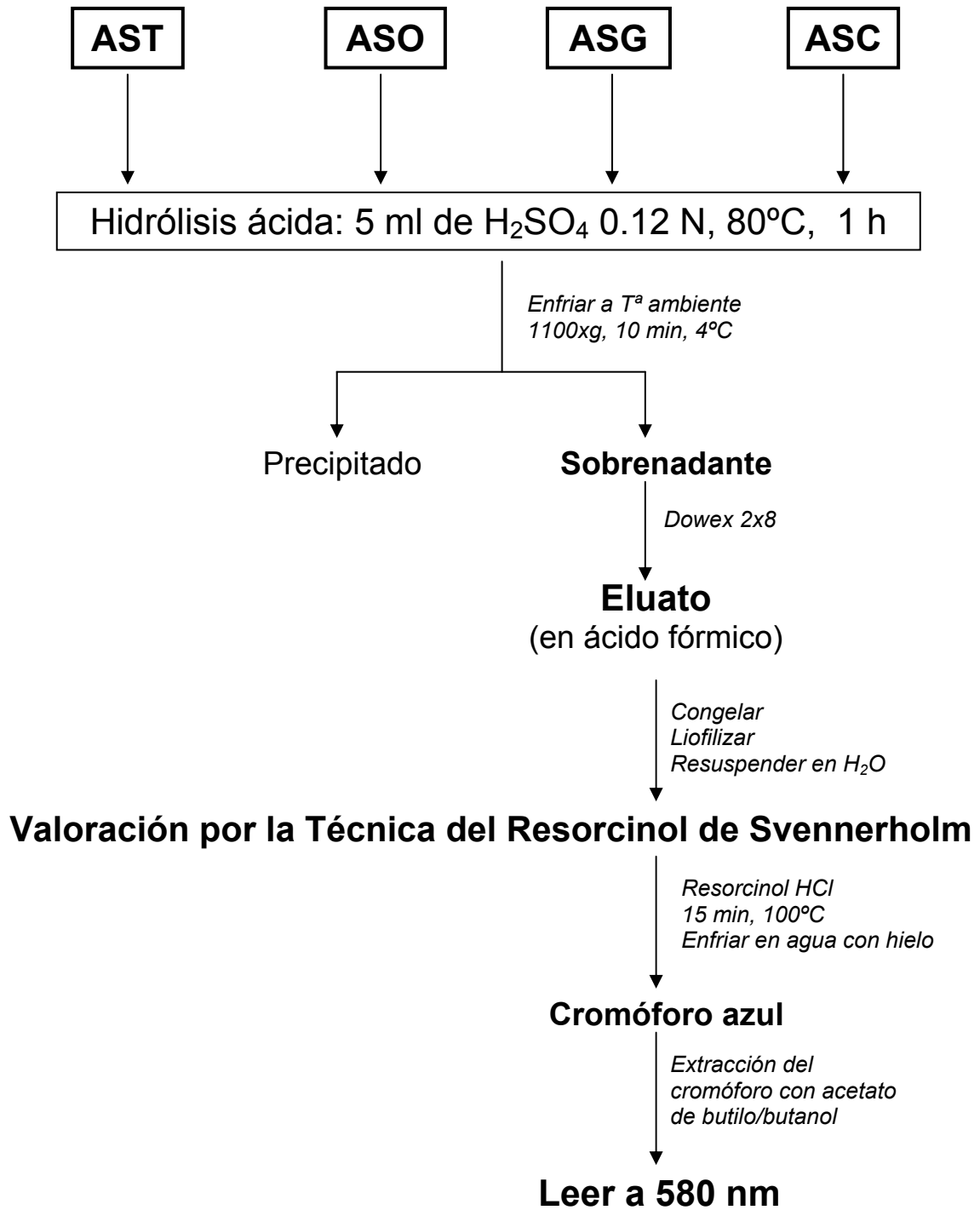


Figura 19. Esquema de la obtención y cuantificación de los ácidos siálicos a partir de las fracciones de sialoglicoconjugados.

2.5.2.1. Técnica del Resorcinol

La cuantificación de los ácidos siálicos se llevó a cabo mediante la técnica colorimétrica del resorcinol de *Svennerholm* (1957) que utiliza el reactivo resorcinol (0.1 g de resorcina + 125 μ l de CuSO_4 0.1 M + 40 ml de HCl concentrado, añadir agua destilada hasta 50 ml). La muestra se incubó con un volumen igual del reactivo resorcinol durante 15 min a 100°C. La reacción se paró introduciendo los tubos en un baño de agua con hielo. El cromóforo azulado formado se extrae con 1 ml de acetato de butilo/butanol 85:15 (v/v). Después de centrifugar los tubos se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 580 nm. Se utilizó ácido *N*-acetilneuramínico de concentración 1 μ g/ μ l como patrón (figura 19).

2.5.2.2. Técnica del Ácido tiobarbitúrico

Los ácidos siálicos libres se valoran mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico (*Aminoff*, 1961) que es específica para estos compuestos pero en forma libre, no conjugada.

Para ello se pasaron 5 ml de la fracción de oligosacáridos (que contiene también los ácidos siálicos libres) por una columna de Dowex 2x8 y se procedió como ya se indicó anteriormente para este tipo de cromatografía.

A las muestras obtenidas, que contienen los ácidos siálicos libres, se les añadió ácido peryódico 25 mM en H_2SO_4 0.125 N, que produce una oxidación peryódica de los ácidos siálicos, durante 1 h a 37°C. Después de enfriar los tubos en agua con hielo se añadió arsenito sódico al 2% en HCl 0.5 N para eliminar el exceso de peryódico, que se libera como yodo molecular. A continuación se añadió 1 ml de ácido tiobarbitúrico y se mantuvieron los tubos durante 7.5 min a 100°C, después de lo cual la reacción se paró en un baño de agua con hielo. El cromóforo formado (rosado) se extrae con butanol ácido (HCl al 5% en butanol), se centrifuga y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 549 nm (figura 20).

Como patrón se utilizó ácido *N*-acetilneuramínico de concentración conocida.

5 ml del sobrenadante de lavados TCA

Dowex 2x8

Eluato
(en ácido fórmico)

Congelar, liofilizar, resuspender en H₂O
Ác peryódico 25 mM en H₂SO₄ 0.125 N, 1 h, 37°C
Enfriar en agua con hielo
Añadir arsenito sódico 2% en HCl 0.5 N
1 ml ácido tiobarbitúrico, 7.5 min, 100°C
Enfriar en agua con hielo

Cromóforo rosado

Extracción del cromóforo con butanol ácido
(HCl 5% en butanol)

Leer a 549 nm

Figura 20. Purificación y valoración de los ácidos siálicos libres.

2.5.3. SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ÁCIDOS SIÁLICOS

Los ácidos siálicos de las muestras se separaron mediante HPTLC en placas de silicagel 60 de 0.1 mm de espesor y tamaño 10x10 cm. Se utilizó como líquido de desarrollo *N*-propanol/amoníaco 0.57 M 7:3 (v/v). La cromatografía se llevó a cabo a una temperatura constante de 20-22°C. Cuando el frente del solvente alcanzó la parte

superior de la placa, ésta se extrajo de la cubeta y se dejó secar a temperatura ambiente. Para llevar a cabo el revelado se pulverizó la placa con resorcinol, se cubrió con una placa de vidrio y se calentó durante 20 minutos a 110°C en una placa calefactora. Las manchas correspondientes a los ácidos siálicos aparecen de color azul-morado.

La identificación de los diferentes tipos de ácidos siálicos se llevó a cabo por comparación de su movilidad relativa con la de los ácidos siálicos de una mezcla patrón.

La cuantificación se llevó a cabo por densitometría en un densitómetro Shimadzu CS9000. El aparato lee las bandas de cada depósito por reflexión a 580 nm, obteniéndose un densitograma con diferentes picos (cada uno de ellos correspondiente a un ácido siálico) cuyas áreas son proporcionales al porcentaje que cada ácido siálico representa en la muestra de partida.

2.6. GANGLIÓSIDOS

El estudio de los gangliósidos comprendió varias etapas: obtención, purificación, separación, identificación y cuantificación.

2.6.1. OBTENCIÓN DE GANGLIÓSIDOS

La extracción de gangliósidos a partir del liofilizado de las muestras de leche se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por *Puente et al.* (1992), que consta de tres pasos sucesivos cuyos objetivos son los siguientes:

-*Paso 1*: separación de los lípidos neutros, fundamentalmente triacilgliceroles, de los lípidos polares. Ésto se consigue empleando acetona fría en la que son solubles los lípidos neutros.

-*Paso 2*: extracción de los lípidos polares restantes que quedan en el extracto seco resultante del paso 1. Con ello separamos los lípidos del resto de los componentes de la leche, tales como proteínas y oligosacáridos. Se emplean mezclas de solventes orgánicos de diferentes proporciones, que se diferencian en su polaridad.

-*Paso 3*: extracción de los gangliósidos de la mezcla de lípidos polares obtenida en el paso 2. Ésto se consigue empleando el sistema de particiones de

Folch. Los gangliósidos, de naturaleza polar, quedan en la fase superior acuosa, mientras que el resto, de menor polaridad, permanecen en la fase inferior orgánica.

A continuación vamos a detallar cada uno de estos procesos.

PASO 1: Obtención del extracto acetónico seco.

Partimos de 30 g de leche liofilizada que homogeneizamos en 10 volúmenes de acetona fría (-20°C) por gramo de liofilizado. Se empleó un “Polytron” con el que aplicamos tres pulsos de un minuto de duración separados por espacios de dos minutos, aproximadamente. La mezcla resultante se sometió a agitación a 4°C, durante 45 min. Transcurrido este tiempo se filtró la mezcla con la ayuda de una bomba de vacío, sobre un filtro de vidrio poroso hasta su desecación. El proceso se repitió una segunda vez a partir del extracto seco resultante.

El residuo sólido obtenido tras la segunda filtración se dejó a temperatura ambiente hasta eliminar completamente la acetona obteniéndose de esta forma el “extracto acetónico seco”.

PASO 2: Obtención del extracto lipídico.

Una vez que el extracto acetónico estaba completamente seco (comprobamos que no huele a acetona), lo homogeneizabamos en 10 volúmenes por gramo de liofilizado de una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) mediante tres pulsos con el “Polytron” como se expuso anteriormente. Se agitó a 4°C durante 45 min y se filtró a vacío con un filtro de vidrio poroso hasta que el residuo quedó completamente desecado. Este proceso de extracción se repitió dos veces más empleando mezclas de cloroformo/metanol 1:2 (v/v) y 1:1 (v/v) respectivamente.

Después de las tres extracciones, el residuo sólido obtenido, que contiene proteínas y oligosacáridos, se desechó, mientras que los filtrados se juntaron y se evaporaron hasta sequedad obteniendo así un “extracto lipídico” que contiene todos los lípidos polares: gangliósidos, otros glicoesfingolípidos, fosfolípidos, etc.

El extracto lipídico se resuspendió en 5 volúmenes por gramo de liofilizado de una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se dejó durante toda una noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se observaba ya la aparición de un precipitado en el fondo del tubo que centrifugamos a 1100xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se evaporó hasta sequedad obteniéndose así un “extracto lipídico” con menos contaminantes (figura 21).

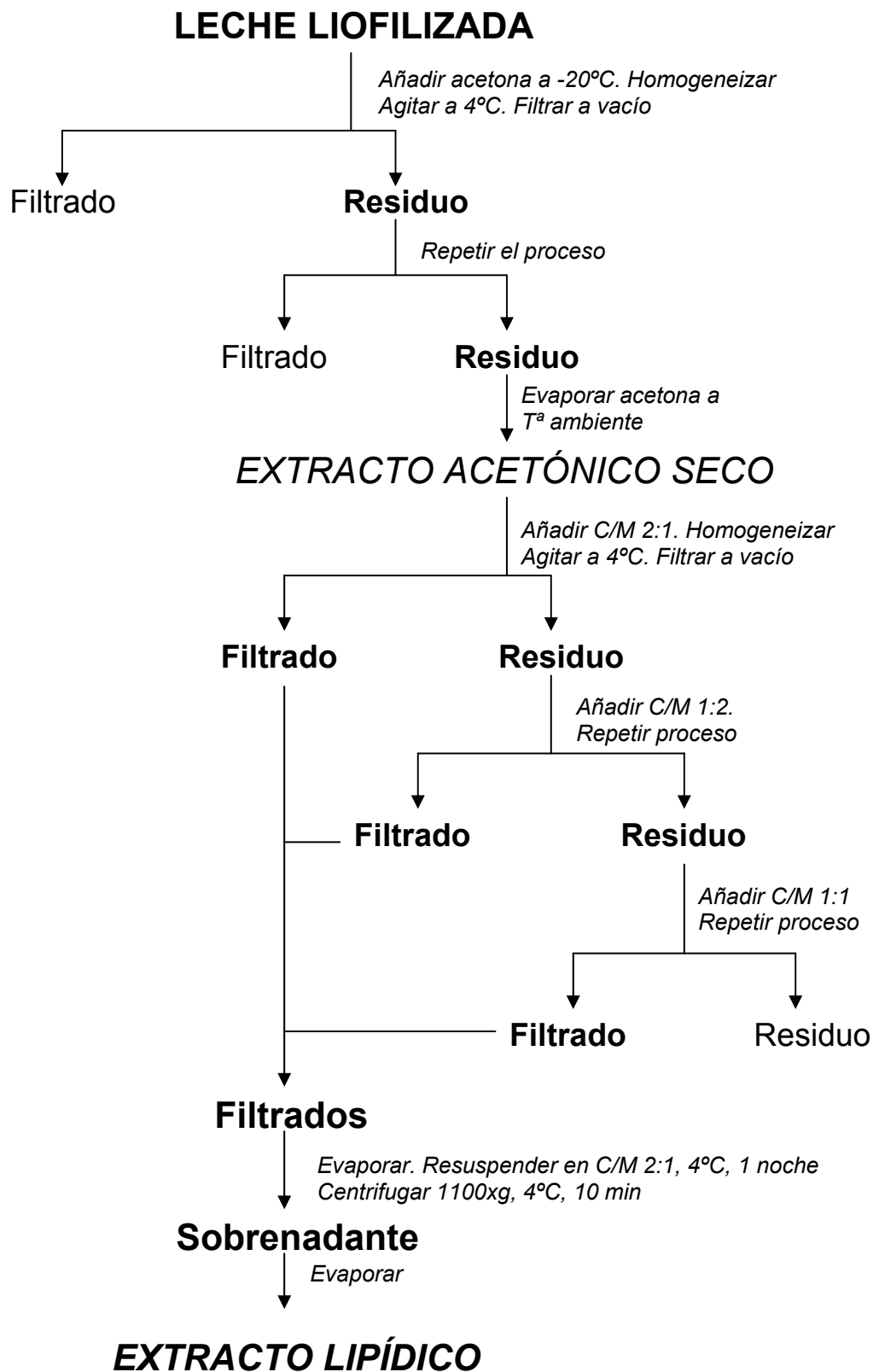


Figura 21. Esquema de la obtención del extracto acetónico y del extracto lipídico de la leche, pasos 1 y 2.

PASO 3: Sistema de particiones de Folch-Pi.

El extracto lipídico resultante se resuspendió en 10 volúmenes de cloroformo/metanol 2:1 (v/v), empleando un baño de ultrasonidos, y se sometió a un sistema de particiones de Folch, modificado por *Vanier et al.* (1971).

Para ello se añadieron al extracto resuspendido en cloroformo/metanol 0.2 volúmenes, tomando como referencia el volumen en el que se resuspendió el extracto lipídico, de KCl al 0.2% frío (almacenado a 4°C), se agitó durante 45 min a 4°C y se centrifugó a 1100xg durante 10 min a 4° C. Se separaron dos fases claramente definidas:

- fase superior, acuosa, que contiene los gangliósidos y que recogemos
- fase inferior, orgánica, en la que se encuentran los demás lípidos

La fase orgánica se mezcló con 0.2 volúmenes de metanol y 0.2 volúmenes de KCl al 0.2%, ambos fríos, se agitó a 4°C y se centrifugó en las condiciones ya expuestas. La fase superior se juntó con la obtenida en el paso anterior, mientras que a la fase inferior se le añadieron 0.2 volúmenes de metanol y 0.2 volúmenes de agua destilada, ambos fríos, repitiéndose el mismo proceso de agitación y centrifugación.

Tras esta última centrifugación se desechó la fase inferior y la fase superior se juntó con las obtenidas en las centrifugaciones anteriores y se evaporaron con el rotavapor hasta sequedad total (figura 22).

El extracto obtenido se sometió a un proceso de diálisis con el fin de eliminar sales, oligosacáridos y demás compuestos de pequeño tamaño molecular. Para ello se disolvió el extracto seco en una pequeña cantidad de agua destilada (de 2 a 4 ml) y se dializó frente a agua destilada durante dos o tres días realizando periódicamente cambios del agua de la diálisis (cuatro o cinco cambios diarios). Se recogió el contenido de la diálisis y se liofilizó.

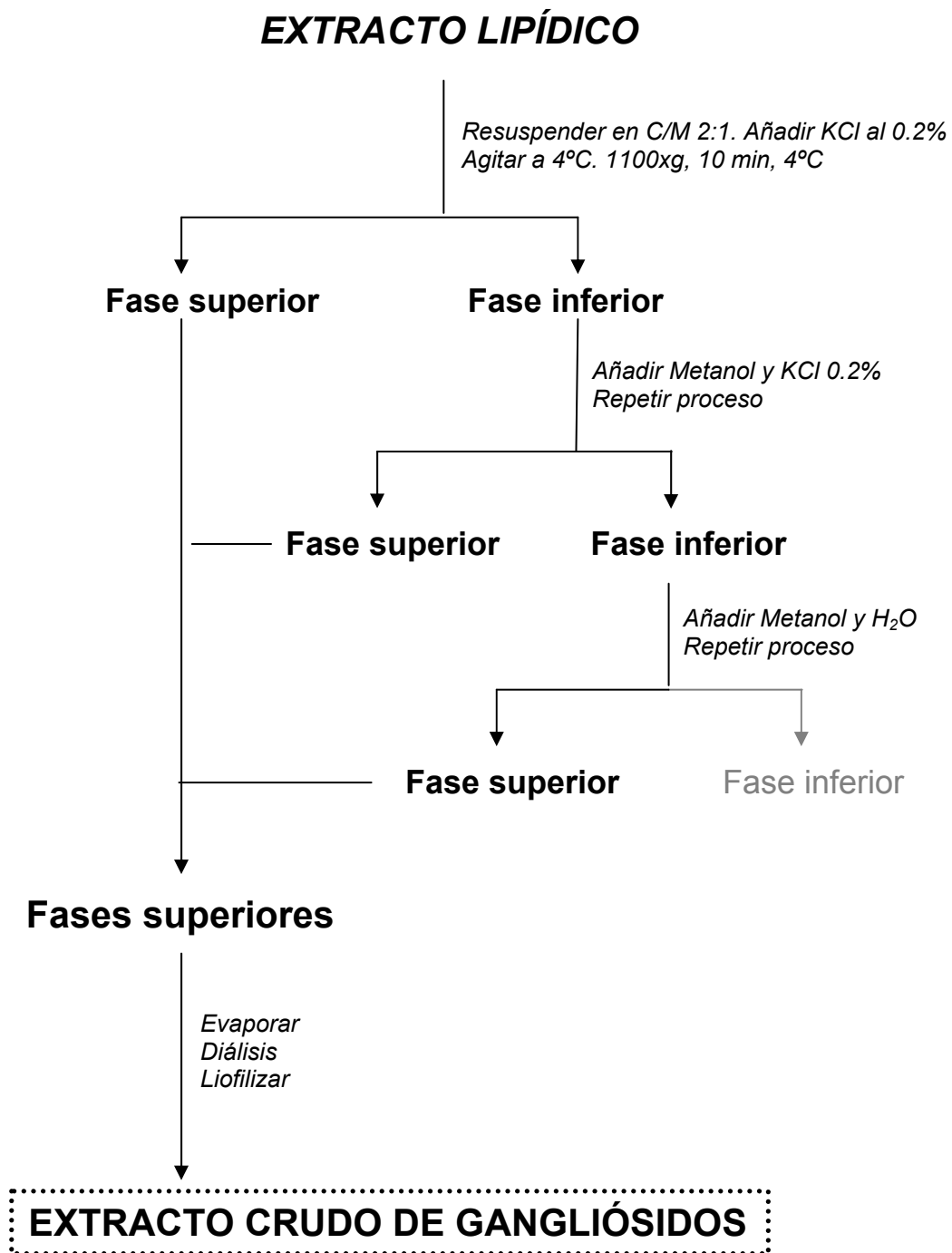


Figura 22. Esquema de la obtención del extracto crudo de gangliósidos de la leche, sistema de particiones de Folch-Pi, paso 3.

2.6.2. PURIFICACIÓN DE GANGLIÓSIDOS

Para llevar a cabo la purificación de los gangliósidos utilizamos la cromatografía de adsorción en Sep Pak C18.

El liofilizado obtenido se resuspendió en metanol/agua 1:1 (v/v) para ser sometido a una cromatografía de adsorción en Sep Pak C18 (*Matyas and Morré, 1987*). Tras pasar la muestra dos veces por la columna, lavamos con 25 ml de agua destilada, que arrastra los compuestos no adheridos a la columna. Los gangliósidos se eluyeron con 25 ml de metanol. El eluato se evaporó hasta sequedad en el rotavapor.

El resultado de este proceso de purificación es una mezcla de los gangliósidos presentes en la leche, que nos sirve como punto de partida para los estudios posteriores.

2.6.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GANGLIÓSIDOS INDIVIDUALES

La determinación del contenido de gangliósidos, que se expresan como ácidos siálicos unidos a lípidos (ASUL), se realizó también según la técnica del resorcinol de Svennerholm ya descrita en esta memoria (apartado 2.5.2.1.).

2.6.3.1. Separación, identificación y cuantificación de los gangliósidos individuales

Los gangliósidos individuales se separaron mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), en placas de silicagel 60 de 0.1 mm de espesor y de un tamaño de 10x10 cm.

Se utilizó como líquido de desarrollo C/M/H₂O, 50:45:10 (v/v/v), conteniendo CaCl₂ al 0.02%, que asciende por capilaridad por la matriz de silica gel arrastrando los gangliósidos en función de su polaridad. Esta característica está determinada por la ceramida, por el componente glucídico y fundamentalmente por los restos de ácidos siálicos que presentan. Para el desarrollo de la cromatografía se procedió de manera similar a lo descrito anteriormente para los ácidos siálicos (apartado 2.5.3.).

El revelado de la placa se realizó con el reactivo resorcinol. Las manchas correspondientes a los ácidos siálicos de los gangliósidos aparecen de color azul-morado.

La identificación de los gangliósidos se llevó a cabo por comparación de su movilidad relativa (Rf) con la de los gangliósidos del patrón (gangliósidos de cerebro bovino y de leche de vaca de composición conocida).

La proporción relativa de cada gangliósido individual (cuantificación) se estimó mediante densitometría en un densitómetro Shimadzu CS9000 de manera similar a como se ha descrito para los ácidos siálicos.

2.6.3.2. Inmunodetección en placa de gangliósidos

La inmunodetección de los gangliósidos se realizó sobre placas HPTLC de aluminio según una técnica desarrollada para la detección de radioisótopos (*Magnani et al.*, 1980) y posteriormente adaptada para el uso con sustratos coloreados (*Muthing*, 1996).

Utilizamos distintos anticuerpos monoclonales desarrollados contra el epítipo glicánico del gangliósido. Son muy pocos los anticuerpos comerciales contra gangliósidos que se encuentran disponibles en el mercado, por ello algunos de los anticuerpos utilizados en este estudio fueron generados en ratón y cedidos amablemente por el Centro de Inmunología Molecular (CIM) de La Habana (tabla 10).

Tabla 10. Anticuerpos monoclonales utilizados.

| Anticuerpo | Tipo de Ig | Antígeno | Origen |
|------------|------------|--------------------|---------------------|
| R24 | IgG | GD3 | CIM |
| Jones | IgM | O-Acetil-GD3 | Sigma |
| Anti-A2B5 | IgM | GT3/9-O-Acetil-GT3 | Boehringer Mannheim |
| 14F7 | IgG | GM3-NeuGc | CIM |
| P3 | IgG | Gangliósidos-NeuGc | CIM |
| Anti-GM1 | IgG | GM1 | Europa Bioproducts |
| Anti-GM2 | IgG/IgM | GM2 | Europa Bioproducts |
| Anti-GD1a | IgM,k | GD1a | Europa Bioproducts |
| Anti-GD1b | IgG3,k | GD1b | Europa Bioproducts |
| Anti-GT1b | IgM | GT1b | Europa Bioproducts |

Procedimos según el protocolo modificado por *Vázquez et al.* (1995) que se detalla a continuación. Primero se sometió una muestra de gangliósidos por duplicado

a una cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) en soporte de aluminio. Se procedió de la misma forma que en la separación de gangliósidos vista anteriormente. Tras la cromatografía se cortó la placa de manera que quedó un depósito en cada una de las mitades. Una de ellas (que nos servirá de control) se sometió a un revelado químico con orcinol (50 mg de Orcinol diluidos en 39.5 ml de agua + 10 ml de H₂SO₄ 96%). Para ello se pulverizó la placa con el reactivo orcinol y se calentó durante 5 minutos a 100°C en una estufa (Svejcar *et al.*, 1993). Las bandas correspondientes a cada gangliósido aparecieron en color azul-morado. La otra mitad se plastificó con PIBMC 0.1% en hexano durante 75 segundos y se dejó secar durante 1 hora. A continuación se plastificaron los bordes con PIMBC 1% y se dejó secar durante toda la noche.

Para bloquear las uniones no específicas, las placas se incubaron en BSA 2% en PBS (8.5 g de NaCl, 1.34 g de Na₂HPO₄ y 0.34 g NaH₂PO₄ en un litro de agua) durante 1 hora en agitación suave. Después se incubaron con el anticuerpo durante 1 hora en agitación. Lavamos con PBS cuatro veces durante 5 minutos en agitación para eliminar el anticuerpo que no se ha unido. Posteriormente se incubaron las placas con un 1^{er} conjugado preparado con anti-Ig biotinilado 1:2000 en BSA 2% en PBS durante 1 hora en agitación. Lavamos con PBS como lo hicimos anteriormente. Incubamos en el 2^o conjugado: estreptavidina-fosfatasa alcalina 1:1000 en BSA 2% en PBS durante 1 hora en agitación. Lavamos y dejamos secar la placa. Se añadió 1 ml de sustrato (FAST-BCIP: una pastilla en 10 ml de agua ultrapura) sobre la placa y se esperó a que aparecieran las bandas. Entonces se lavó con agua y se dejó secar (Figura 23).

INMUNODETECCIÓN

1. Bloquear la placa con BSA 2% en PBS durante 1 h con agitación suave
2. Incubar con el 1^{er} anticuerpo durante 1 h en agitación
3. Lavar con PBS durante 5 min, 4 veces
4. Incubar con el 1^{er} conjugado: anti-IgG biotinilado 1:2000 en BSA 2% en PBS durante 1 h en agitación
5. Repetir lavados con PBS
6. Incubar con el 2^o conjugado: estreptavidina-fosfatasa alcalina 1:1000 en BSA 2% en PBS durante 1 h en agitación
7. Lavados con PBS
8. Revelar con el sustrato FAST-BCIP
9. Lavar con agua y secar

Figura 23. Protocolo de inmunodetección de gangliósidos.

2.7. GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS

En el caso de los glicosfingolípidos neutros procedimos como para los gangliósidos: obtención, purificación, separación, identificación, cuantificación y además estudio de sus ácidos grasos.

2.7.1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS

La obtención de los glicosfingolípidos neutros se llevó a cabo a partir de la fase inferior resultante del sistema de particiones de Folch-Pi que se realizó para obtener los gangliósidos. La fase inferior se evaporó a sequedad con el rotavapor.

El extracto obtenido se resuspendió en 3 ml de cloroformo para ser sometido a una cromatografía de adsorción en una columna con 5 g de ácido silícico en cloroformo (*Newburg and Chaturvedi, 1992*). Tras pasar la muestra por la columna, lavamos con 50 ml de cloroformo. Los glicosfingolípidos neutros se eluyeron con acetona/metanol (9:1). El eluato se evaporó hasta sequedad en el rotavapor.

Esta fracción de glicosfingolípidos se sometió a una hidrólisis alcalina con 3 ml de NaOH 0.6 M en metanol y 3 ml de cloroformo, para hidrolizar restos de ésteres de glicerol y ácidos grasos. Tras 1 hora a temperatura ambiente se paró la reacción con 4.5 ml de HCl 0.4 M y se estableció un sistema de particiones de Folch añadiendo 3 ml de metanol y 9 ml de cloroformo. Se agitó durante 10 minutos. Se retiró la fase superior, que contiene sales y productos de la hidrólisis, y se lavó la fase inferior dos veces con 3 ml de C/M/H₂O (3:48:47), repitiendo el proceso anterior. Se evaporó a sequedad con el rotavapor la fase inferior resultante.

El extracto obtenido se sometió por segunda vez a una cromatografía de adsorción en ácido silícico para eliminar los posibles restos de ácidos grasos (figura 24).

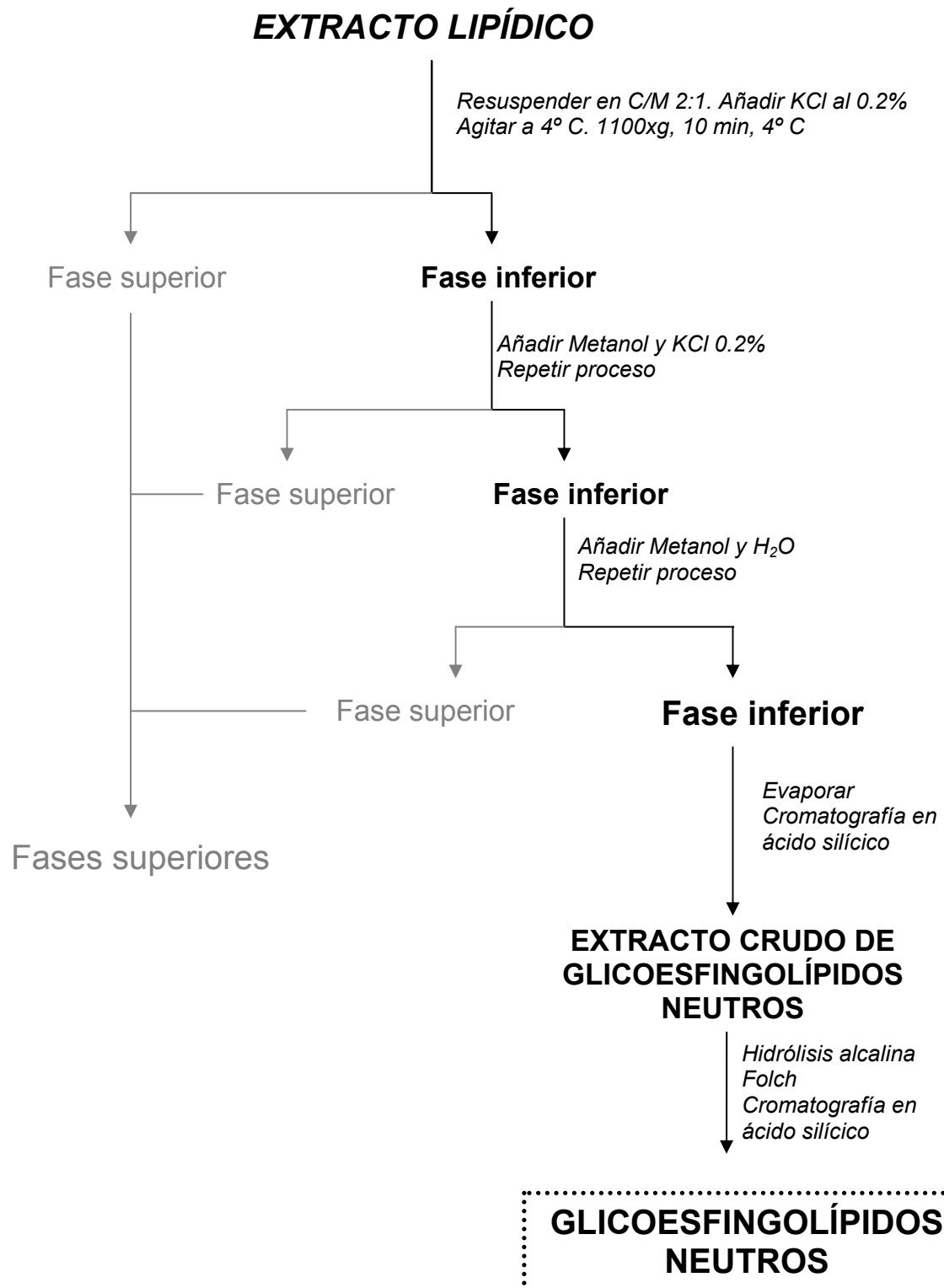


Figura 24. Esquema de la obtención y purificación de los glicosfingolípidos neutros.

2.7.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS

Los glicosfingolípidos neutros individuales se separaron mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), en placas de silicagel 60 de 0.1 mm de espesor y de un tamaño de 10x10.

Se utilizó como líquido de desarrollo C/M/H₂O 60:35:8 (v/v). La cromatografía se llevó a cabo a una temperatura constante de 20-22°C.

Para llevar a cabo el revelado, se pulverizó la placa con orcinol y se calentó a 100°C durante 5 minutos en una estufa (apartado 2.6.3.2.). Las bandas correspondientes a los glicosfingolípidos neutros aparecieron de color azul-morado.

La identificación de los glicosfingolípidos neutros se llevó a cabo por comparación de su movilidad relativa (Rf) con la de los glicosfingolípidos del patrón.

La cuantificación total y relativa de cada glicosfingolípidos neutro se llevó a cabo por densitometría en un densitómetro Shimadzu CS9000 leyendo las bandas a una longitud de onda de 515 nm.

2.7.2.1. Valoración de glicosfingolípidos neutros

Para cuantificar los glicosfingolípidos neutros totales contenidos en la leche de oveja se utilizó un método indirecto que fue descrito por *Rosengren et al.* en 1987 para la valoración de glicolípidos neutros en cerebro. Consistió en depositar una cantidad conocida de patrón (glucosilceramida) y una cantidad de la muestra de glicosfingolípidos neutros a valorar en una placa de HPTLC que se desarrolló utilizando C/MH₂O 60:35:8 (v/v). Después se reveló con orcinol, tal y como se describe en el apartado anterior y se comparó el área de los picos de los glicosfingolípidos neutros de la muestra con el área del patrón, en el densitograma correspondiente.

2.7.2.2. Inmunodetección de glicosfingolípidos neutros en placa

De la misma manera que ocurre con los gangliósidos, no es fácil encontrar anticuerpos comerciales contra glicosfingolípidos neutros, por tanto sólo pudimos probar un anticuerpo contra galactosilceramida (tabla 11).

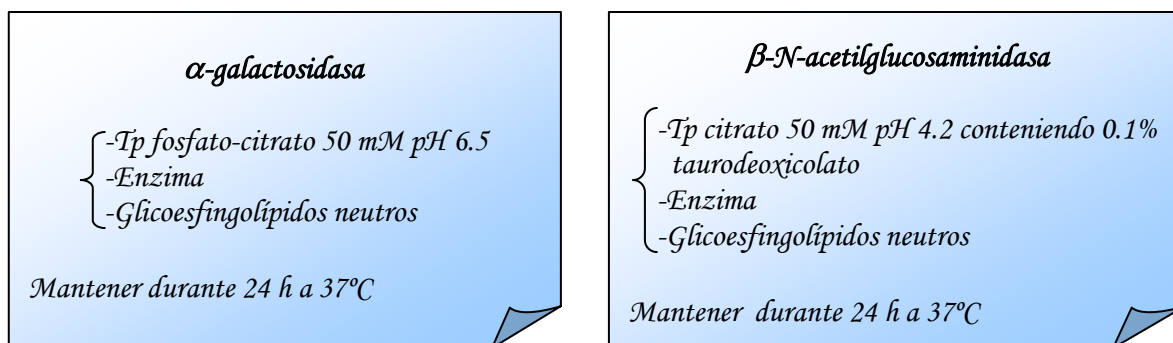
Tabla 11. Anticuerpos utilizados contra glicosfingolípidos neutros.

| Anticuerpo | Tipo de Ig | Antígeno | Origen |
|-------------------------|------------|--------------------|--------------------|
| Anti-Galactocerebrósido | IgG3 | Galactosilceramida | Europa Bioproducts |

Para ello procedimos como ya hicimos en el caso de los gangliósidos (apartado 2.6.3.2.).

2.7.2.3. Pruebas enzimáticas

También llevamos a cabo varias pruebas enzimáticas para la identificación de los glicosfingolípidos neutros. Usamos una α -galactosidasa que debería actuar sobre el Gb3, hidrolizando la galactosa terminal, y formando así lactosilceramida; y una β -N-acetilglucosaminidasa que debería actuar sobre el Gb4 hidrolizando la N-acetilgalactosamina terminal, formando Gb3 (figura 25).

**Figura 25.** Protocolo de las pruebas enzimáticas.

Una vez llevadas a cabo las reacciones enzimáticas lavamos la mezcla de reacción con 4 volúmenes de C/M 2:1 (v/v), formándose dos fases. Lavamos la fase inferior dos veces con C/M/H₂O 3:48:7 (v/v). La fase inferior obtenida, que contenía los glicosfingolípidos neutros, se evaporó a sequedad y quedó lista para su utilización. Se realizaron cromatografías en capa fina de alta resolución para establecer las diferencias en las cantidades de glicosfingolípidos neutros presentes antes y después del proceso de hidrólisis.

2.7.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS

Para la determinación del contenido de ácidos grasos se partió de 50 μg de glicoesfingolípidos neutros que se evaporaron a sequedad en un vial con cierre de teflón. A continuación se le añadieron 300-400 μl de metanol/HCl 0.5 M, con objeto de separar los ácidos grasos de los glicoesfingolípidos neutros en forma de ésteres metílicos, se resuspendieron empleando una pipeta Pasteur y un baño de ultrasonidos, y se mantuvieron en estufa a 80°C durante 20 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se procedió a la extracción de los ésteres metílicos con hexano. Para ello, se añadieron al metanolizado 1.5 ml de hexano, se agitó vigorosamente y se centrifugó 5 min a 405xg. La fase superior, que contiene los ésteres metílicos, se pasó a un vial pequeño y a la fase inferior se le añadieron 1.5 ml de hexano repitiéndose de nuevo el proceso descrito anteriormente. Las fases superiores se evaporaron con N_2 , se resuspendieron en isooctano y los ésteres metílicos se identificaron y se cuantificaron mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Shimadzu G17A equipado con una columna capilar TRACSIL TR-WAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu MS QP 5000 del Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca. Las condiciones de trabajo fueron: T^{a} inyector, 210°C; T^{a} detector, 240°C. El programa empleado: T^{a} inicial, 130°C durante 3 min; de 130 a 190°C un incremento de 15°C/min; de 190 a 230° C un intervalo de 2°C/min; finalmente 25 min a 230°C.

El sistema proporciona un cromatograma con una serie de picos que corresponden cada uno de ellos a un éster metílico de un ácido graso. Los diferentes picos se identificaron mediante sus espectros de masas característicos. Los resultados de la cuantificación se expresan en % (razón molar) (figura 26).

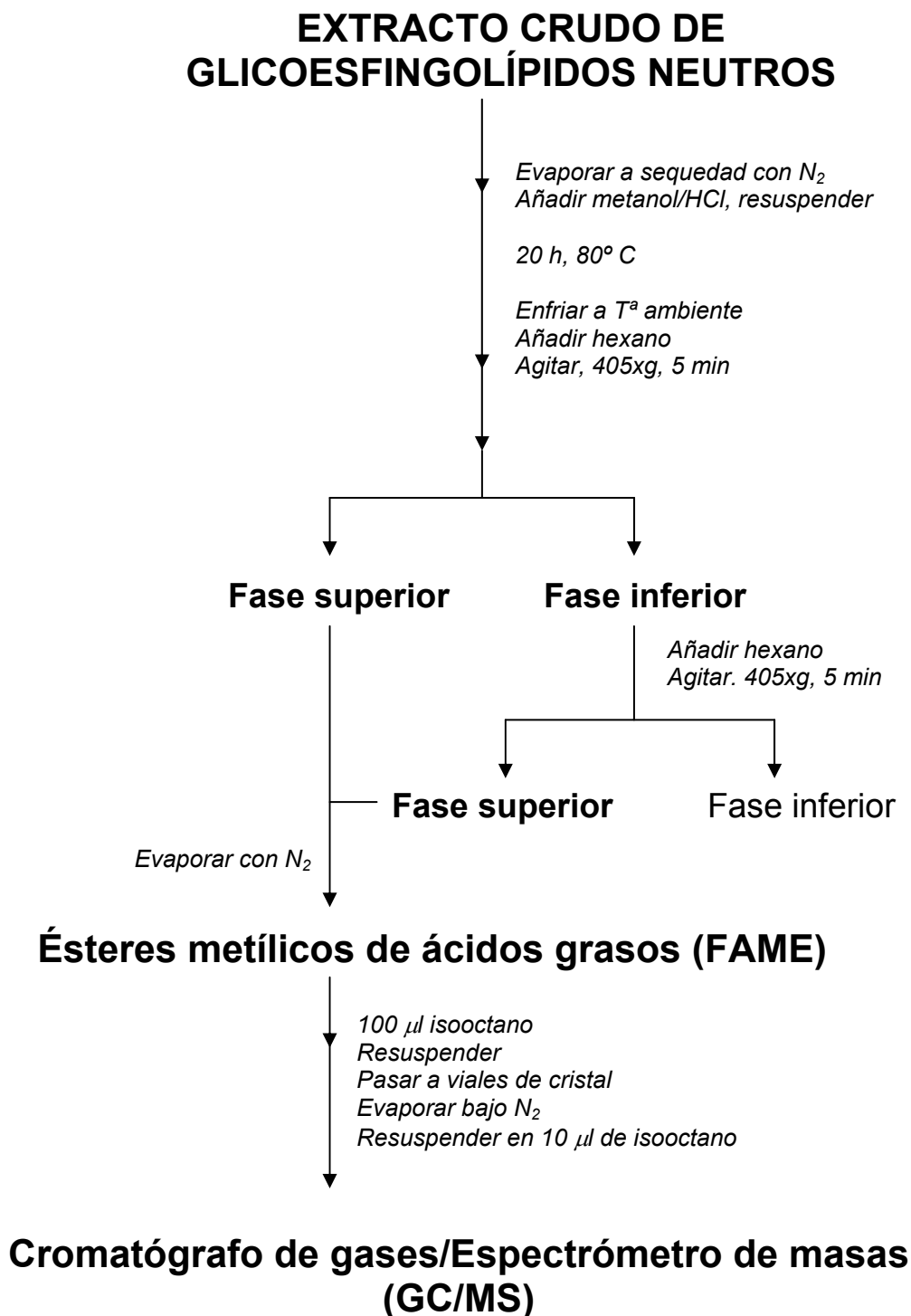


Figura 26. Esquema de la metanolisis de glicoesfingolípidos neutros.

2.8. FOSFOLÍPIDOS

De la misma manera que se hizo con los gangliósidos y glicoesfingolípidos neutros, el primer paso fue la obtención de los fosfolípidos para posteriormente proceder a su valoración y estudiar sus ácidos grasos.

2.8.1. OBTENCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS

La obtención de los fosfolípidos se realizó a partir de la fase inferior resultante del sistema de particiones de Folch-Pi que se llevó a cabo para obtener los gangliósidos. La fase inferior se evaporó a sequedad con el rotavapor (figura 27).

2.8.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS

La cuantificación de los fosfolípidos totales se llevó a cabo por la técnica de valoración del fósforo (*Rouser et al, 1970*). Para ello se sometió la muestra de fosfolípidos a una hidrólisis ácida con HClO_4 al 70% a 190°C durante 45 minutos, para liberar el fósforo de los fosfolípidos. Transcurrido este tiempo se paró la reacción con 700 μl de H_2O y se valoró el fósforo inorgánico liberado de forma colorimétrica. Para ello se añadieron 100 μl de molibdato amónico, se agitó, se añadieron 100 μl de vitamina C y se agitó de nuevo. Se calentó 5 minutos al baño maría y se enfrió. Se centrifugó para eliminar el silicagel. Se obtuvo un cromóforo azulado cuya absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 797 nm. La cantidad de fosfolípidos se obtuvo al multiplicar por 25 el valor de fósforo obtenido en la muestra ya que 1 μg de fósforo lipídico procede de 25 μg de fosfolípidos, tal como indicaron *Barber y Jamieson (1970)*.

Para llevar a cabo la separación cromatográfica de los fosfolípidos individuales y para el estudio de sus ácidos grasos, los fosfolípidos totales se purificaron previamente mediante TLC (se eliminan restos de lípidos conteniendo ácidos grasos). Para ello sometimos la muestra a una cromatografía en capa fina (TLC) unidimensional que se llevó a cabo en placas de silicagel 60 de un tamaño de 5x20 cm. Se utilizó como líquido de desarrollo éter petróleo/éter etílico/ácido acético 85:15:2 (v/v) (*Astaire et al., 2003*). El revelado se llevó a cabo con vapores de yodo. Con esta técnica los fosfolípidos quedan localizados en el depósito de la placa (no se desplazan), mientras que el resto de lípidos, como pueden ser colesterol y

triacilgliceroles, son arrastrados por el frente. A continuación se raspó el depósito donde estaban situados los fosfolípidos y se realizaron sucesivos lavados con C/M 2:1 (v/v) para extraerlos del silicagel.

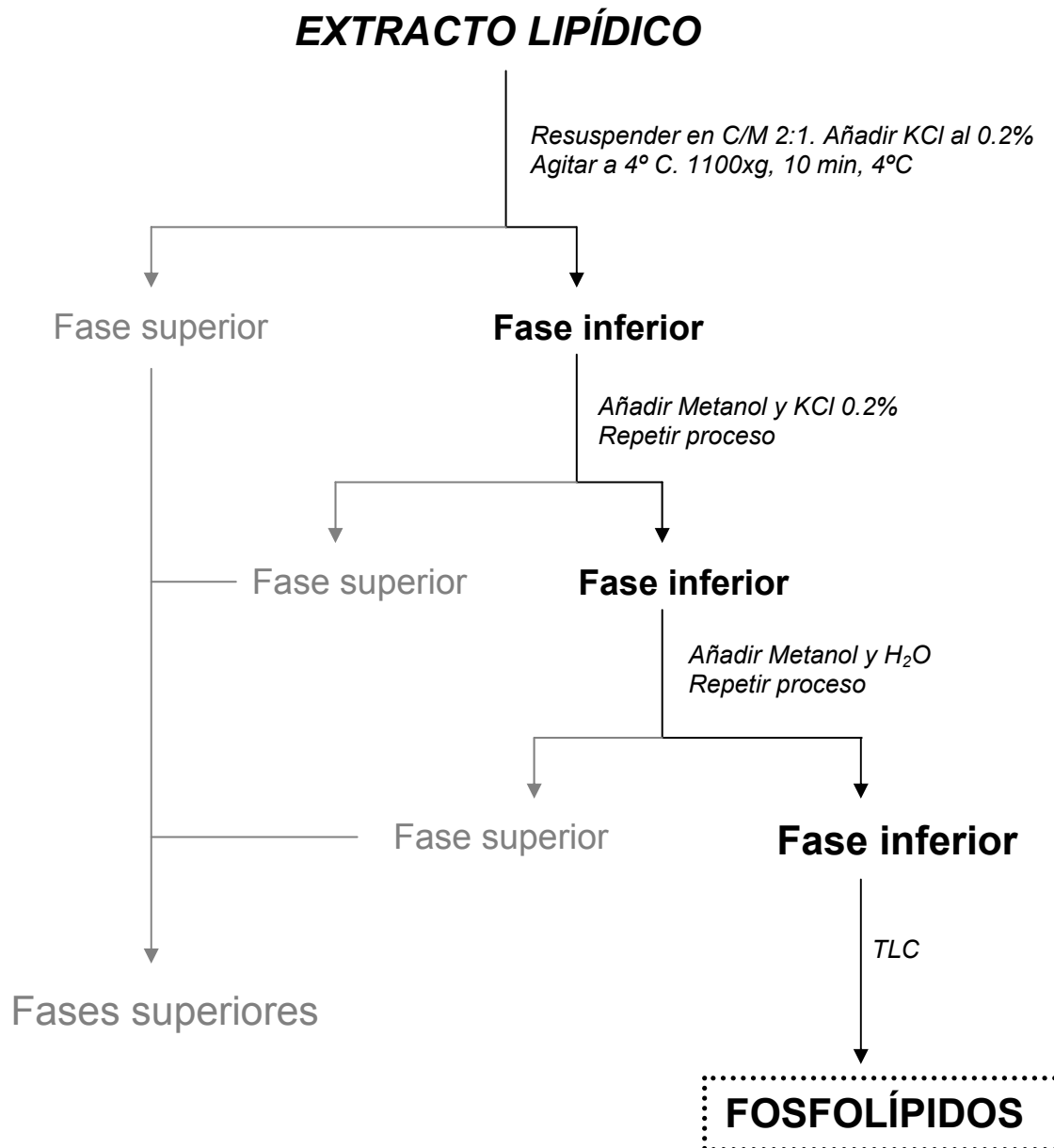


Figura 27. Esquema de la obtención de fosfolípidos.

Seguidamente se llevó a cabo la separación de los fosfolípidos mediante una cromatografía en capa fina bidimensional, que es la forma más habitual de separar los fosfolípidos.

La cromatografía en capa fina (TLC) bidimensional, se llevó a cabo en placas de silicagel 60 de un tamaño de 10x20 cm. Las placas se desarrollaron en una primera dirección utilizando como líquido de desarrollo C/M/NH₃/H₂O 60:36:3.7:3.7 (v/v). Cuando el frente alcanzó la parte superior de la placa, ésta se extrajo de la cubeta y se dejó secar a temperatura ambiente. Para asegurar una mejor separación de los fosfolípidos, la placa se volvió a someter al mismo líquido de desarrollo por segunda vez, se dejó secar a temperatura ambiente hasta que desapareció el olor a amoníaco por completo, desarrollándose entonces en una segunda dirección perpendicular a la anterior utilizando como líquido de desarrollo C/M/ácido acético/H₂O 90:40:12:2 (v/v) (*Broekhuysse*, 1969). Para llevar a cabo el revelado, se pulverizó la placa con el reactivo Phospray, y se dejó a temperatura ambiente hasta que aparecieron las manchas azules correspondientes a los fosfolípidos individuales. La identificación de los fosfolípidos se llevó a cabo por comparación de su movilidad relativa (Rf) con la de fosfolípidos patrón.

Como la cromatografía en capa fina bidimensional no separa PS y PI, sometimos una muestra de fosfolípidos purificados a una cromatografía en capa fina unidimensional utilizando un líquido de desarrollo que permite la separación de cada fosfolípido individual. El líquido utilizado fue: C/M/ácido acético/H₂O 50:37.5:3.5:2 (v/v) (*Fried*, 1996).

Posteriormente se rasparon cada una de las manchas obtenidas tanto en la cromatografía bidimensional como en la unidimensional para obtener los fosfolípidos de forma individual. La cuantificación de los fosfolípidos individuales se llevó a cabo por la técnica de valoración del fósforo, como se hizo con los fosfolípidos totales. Los fosfolípidos así obtenidos se utilizaron también para el estudio de sus ácidos grasos.

2.8.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLÍPIDOS TOTALES E INDIVIDUALES

Esta determinación está basada en el procedimiento utilizado por *Martín-Valmaseda et al.* (1998). En primer lugar se procedió a la formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos, que se llevó a cabo según el método de *Metcalfe et al.* (1966), a excepción de la esfingomielina, para la que el procedimiento utilizado fue el mismo que el de los glicoesfingolípidos neutros (apartado 2.7.3.) ya que ésta es un esfingofosfolípido.

En primer lugar se disolvió la muestra correspondiente en 1 ml de éter de petróleo. Se añadieron 750 μ l de BF_3 -metanol. Se proporcionó una atmósfera de nitrógeno, se agitó y se incubó a 100°C durante 45 minutos. Pasado este tiempo se enfrió en hielo y se paró la reacción con 500 μ l de H_2O destilada. Se agitó y se centrifugó a 2500 r.p.m. La fase superior que contiene los ésteres metílicos, se pasó a un vial pequeño y a la fase inferior se le añadieron 500 μ l de éter de petróleo. Se agitó y se centrifugó a 2500 r.p.m. La fase superior se recogió en el mismo vial. Las fases superiores se evaporaron con nitrógeno, se resuspendieron en isooctano y se identificaron mediante cromatografía de gases como ya se ha descrito anteriormente (apartado 2.7.3.).

2.9. OLIGOSACÁRIDOS

Los oligosacáridos se obtuvieron a partir de la leche, se purificaron y se analizaron mediante HPTLC.

2.9.1. OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS

Para la obtención de los oligosacáridos partimos de la leche liofilizada reconstituida en agua. Se centrifugó a $6500\times g$ durante 20 minutos a 4°C . La grasa de la leche, que se quedó en la parte superior formando una película compacta, se eliminó. El suero de la leche se filtró a través de lana de vidrio para eliminar los restos de grasa que pudieran quedar. Al filtrado resultante se le añadió un volumen igual de etanol concentrado frío y se mantuvo durante 2 horas en hielo y en agitación. Tras las 2 horas se centrifugó a $6500\times g$ durante 1 hora a 4°C . Se recogieron los sobrenadantes. El precipitado se lavó con etanol frío al 66% y se centrifugó otra vez a $6500\times g$ durante 1 hora a 4°C . Se recogieron los sobrenadantes junto con los anteriores. Posteriormente se evaporó el etanol en el rotavapor y se liofilizó el residuo. Después se resuspendió la muestra en agua destilada y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de $0.45\ \mu\text{m}$. A continuación se inyectó la muestra en una columna de Sephadex (HiPrep 26/10 Deslting). La columna se lavó con agua durante 2 horas a un flujo de 0.60 ml/hora. Recogimos el intervalo de fracciones que contienen los oligosacáridos y desechamos las que contenían la lactosa (figura 28).

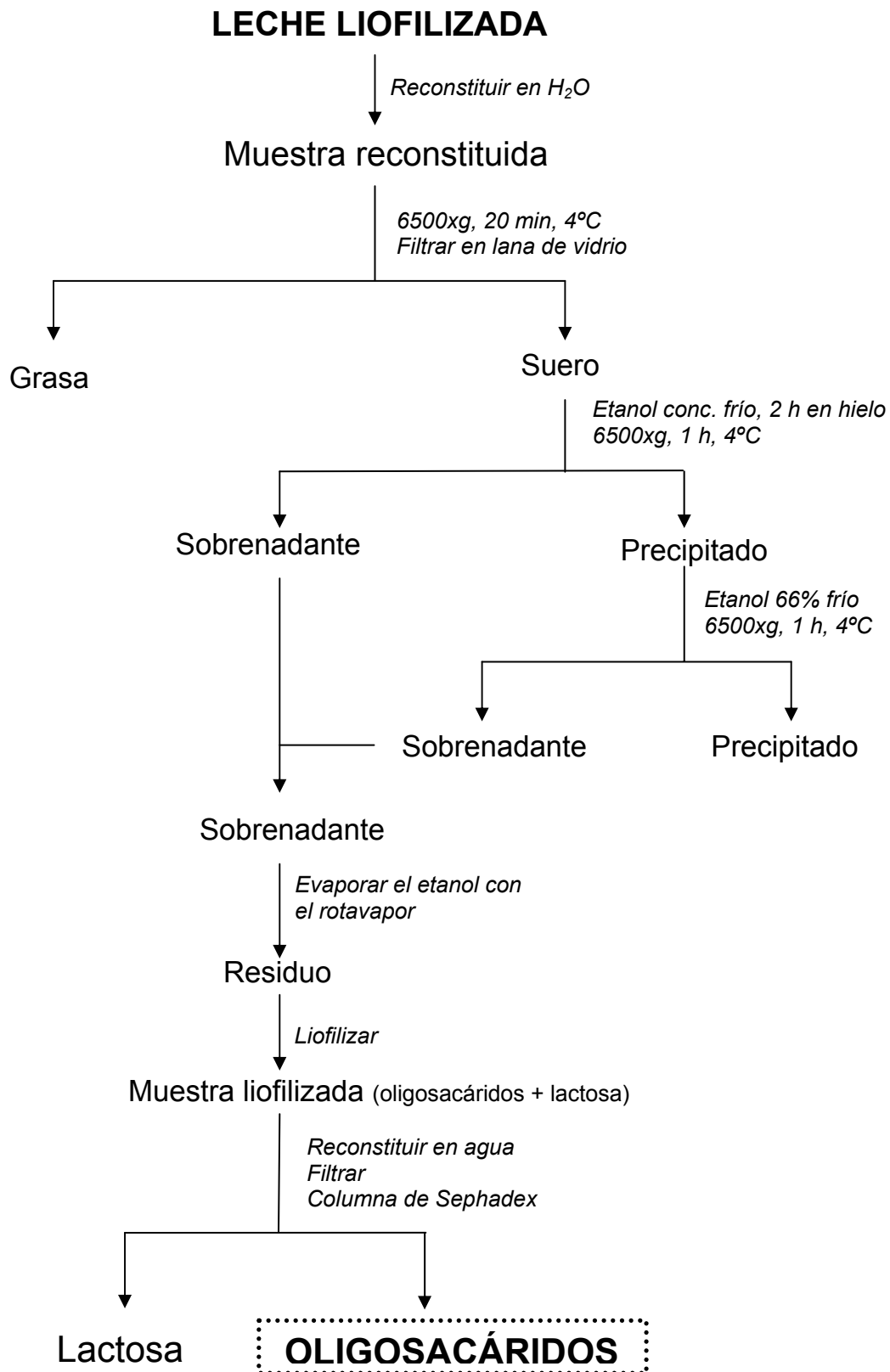


Figura 28. Obtención de oligosacáridos

Los oligosacáridos se congelaron para su posterior liofilización (Kunz *et al.*, 1996).

2.9.2. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS

La separación de los oligosacáridos se realizó mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), como ya se ha descrito anteriormente, utilizando dos líquidos de desarrollo diferentes:

- butanol/H₂O/ácido acético 110:45:45 (v/v)

- butanol/etanol/H₂O/ácido acético/piridina 5:50:15:1.5:5 (v/v)

propuesto por Kunz *et al.* (1996). Se obtuvieron mejores resultados con el segundo de ellos.

La identificación se llevó a cabo por comparación de su movilidad relativa con la de patrones de oligosacáridos comerciales.

La separación de oligosacáridos también se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH alto con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD). Estos análisis se realizaron bajo la supervisión del Dr. Clemens Kunz durante una estancia en su laboratorio en el Instituto de Ciencias Nutricionales de la Universidad de Giessen (Alemania) a lo largo de la primavera-verano de 2007. Aquí obtuvimos un cromatograma en el que cada pico corresponde a un oligosacárido, si bien no pudieron ser identificados en su totalidad.

Por último se intentó su identificación mediante espectrometría de masas, que amablemente fue realizada por el Dr. Gottfried Pohlentz de la Universidad de Munich.

2.10. ADHESIONES BACTERIANAS

Para llevar a cabo los experimentos de adhesión bacteriana, ya fuesen las pruebas de hemaglutinación, o los ensayos de adhesión a glicoesfingolípidos y oligosacáridos en placa, se utilizaron cepas enterotoxigénicas de *E. coli* (ETEC) y cepas uropatogénicas de *E. coli* (UPEC), cedidas por el Dr. Jorge Blanco del Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo). Las ETEC causan enterocolitis en terneros, mientras que las UPEC son una causa importante de pielonefritis y cistitis en humanos (Hull *et al.*, 1984).

Se emplearon diferentes cepas, cuyas características se recogen en la tabla 12.

Tabla 12. Principales características de las cepas de *E. coli* utilizadas.

| Cepa | Serotipo | Adhesina |
|--------|----------|--------------|
| K99-12 | O8 | K99 |
| F41-15 | O20 | F41 |
| K99-4 | O101 | K99+F41 (FK) |
| CCB1 | O101 | F17/Att25 |
| FVL3 | O6:H1 | P |
| FVL25 | O2:H1 | P-like |

Para mayor comodidad, a partir de ahora utilizaremos, en el caso de las ETEC, el nombre de la adhesina expresada en lugar del de la cepa.

Las bacterias se cultivaron en un incubador estático a 37°C durante 3-5 días en medio líquido Mueller-Hinton (tabla 13) (*Blanco y Blanco*, 1993). Al ser éste un medio rico, las bacterias no expresan las fimbrias. Posteriormente las ETEC se sembraron en placas de agar-Minca con Isovitale X (tabla 13) (*Guinee et al.*, 1977) y las UPEC se sembraron en placas con agar-CFA (tabla 13) y se incubaron a 37°C durante una noche para conseguir así la expresión de fimbrias.

Tabla 13. Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados.

| COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS | |
|---------------------------|---|
| Mueller-Hinton | 21 g de medio Mueller-Hinton en 1 l de agua ultrapura. Autoclavar. |
| Agar-Minca | 1 g de casaminoácidos + 1.36 g de KH_2PO_4 + 17.2 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$ + 15 g de agar + 1 ml de solución de sales traza ¹ , en un litro de agua ultrapura. Autoclavar. Dejar enfriar y cuando esté a 45-50°C añadir 10 ml de BBL IsovitaleX. |
| Agar-CFA | 10 g de casaminoácidos + 1.5 g de extracto de levadura + 20 g de agar + 1 ml de solución de sales traza ² , en un litro de agua ultrapura. Autoclavar. |

¹Solución de sales traza (Agar-Minca): 1 g de $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ + 0.1 g de $\text{MnCl}_2(4\text{H}_2\text{O})$ + 13.5 mg de $\text{FeCl}_3(6\text{H}_2\text{O})$ + 42 mg de $\text{CaCl}_2(3.5\text{H}_2\text{O})$, en 100 ml de agua ultrapura.

²Solución de sales traza (Agar-CFA): 10.2 g de $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ + 0.8 g de $\text{MnCl}_2(4\text{H}_2\text{O})$, en 100 ml de agua ultrapura.

Además se realizaron controles negativos para la expresión de fimbrias incubando las bacterias a 18°C durante una noche tal y como describieron *Kyogashima et al.* (1989).

La cantidad de bacterias se expresa como unidades formadoras de colonias (UFC). Los valores aproximados de UFC utilizados en cada experimento se obtuvieron a partir de rectas de calibrado que relacionan la absorbancia a 650 nm de una determinada dilución con el número de UFC.

Para la elaboración de estas rectas se hicieron una serie de diluciones de las bacterias recogidas de un cultivo en medio sólido y tras sembrar las diferentes diluciones se mantuvieron a 37°C toda la noche. Tras ello se contaron las colonias correspondientes a cada dilución y se corrigió el número de UFC multiplicando por los factores de corrección correspondientes (nº de dilución y volumen inicial recogido).

Según estas rectas establecimos las siguientes relaciones:

| Cepa | Nº UFC (en una placa Petri sin diluir) |
|-------------|---|
| K99 | 5.36×10^{10} |
| F41 | 4.49×10^{11} |
| FK | 2.18×10^9 |
| Att25 | 1.57×10^{10} |
| FVL25 | 4.00×10^{10} |
| FVL3 | 1.10×10^{10} |

Una de las formas más utilizadas para comprobar que las bacterias han expresado fimbrias es observar su capacidad para aglutinar eritrocitos (*Evans et al.*, 1979). La hemaglutinación se produce debido al reconocimiento de los glicanos de la membrana de los eritrocitos por parte de las adhesinas bacterianas.

Las cepas de *E. coli* utilizadas presentan pilus de tipo 1 en superficie cuya capacidad hemaglutinante es sensible a manosa (Blanco, comunicación personal). Por este motivo realizamos nuestros experimentos en presencia de manosa al 3% con la intención de que la capacidad hemaglutinante observada fuese sólo la debida a la

expresión de las adhesinas fimbriales características de cada una de las cepas y no a los pilus tipo 1.

Desde hace mucho tiempo se conoce la capacidad hemaglutinante de las fimbrias K99 con respecto a los eritrocitos de caballo (*Lindahl y Wadstrom, 1984*). Por ello decidimos utilizar para nuestros ensayos eritrocitos de caballo y dado que nuestro estudio tiene como base la leche de oveja, decidimos utilizar también eritrocitos de ovino.

La sangre de ovino fue proporcionada por el Matadero Comarcal ASOCARSA S.A. (Salamanca), y recogida en recipientes conteniendo 25 ml de anticoagulante citrato/fosfato/glucosa/adenina (CPD-A₁) (15 mM ácido cítrico, 88 mM citrato sódico, 16 mM fosfato monisódico, 140 mM glucosa y 2 mM adenina) (*Scout y Slichter, 1980*). La sangre recogida se transportó en hielo hasta el laboratorio y se centrifugó a 600xg durante 15 min para sedimentar los eritrocitos y separarlos del plasma, rico en plaquetas y leucocitos, que fue desechado. Los eritrocitos se lavaron 2-3 veces consecutivas con 5 volúmenes de tampón PBS y se centrifugaron a 1200xg durante 10 min. Tras desechar el sobrenadante, los eritrocitos se resuspendieron en solución PBS a una concentración del 5%.

Los eritrocitos del caballo fueron enviados gentilmente por el Laboratorio de Grupos Sanguíneos, Servicio de Cría Caballar (Córdoba) y fueron procesados de la misma manera.

Las bacterias se crecieron en placas de agar-Minca (o agar-CFA, dependiendo de la cepa) y como se describe anteriormente a 37°C durante toda la noche. Después se recogieron en 1 ml de PBS y se realizaron diferentes diluciones dado que la concentración inicial de bacterias era tan grande que provocaba una hemaglutinación no susceptible de inhibición.

2.10.1. ENSAYOS DE HEMAGLUTINACIÓN

Se buscó siempre la dilución bacteriana que contenía un n° de UFC/ml suficientes para hemaglutinar pero que también nos diese la posibilidad de realizar los ensayos de inhibición de la hemaglutinación con los diferentes compuestos utilizados. Nos pareció conveniente utilizar tres diluciones distintas de cada cepa en los ensayos, para así observar con mayor claridad la eficacia de los distintos compuestos a la hora de inhibir la hemaglutinación.

En concreto, se estudió la capacidad de inhibición de la hemaglutinación de oligosacáridos de leche de oveja y de dos patrones comerciales, la 3'-sialillactosa y la galactosil α 1-3lactosa.

Se utilizó la cantidad de 25 μ g/pocillo de oligosacáridos, 3'-sialillactosa y galactosillactosa, respectivamente.

Para estos ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo cónico. Una vez preparados los eritrocitos y las bacterias, el protocolo que se siguió para realizar los ensayos de hemaglutinación fue el que se muestra en la figura 29.

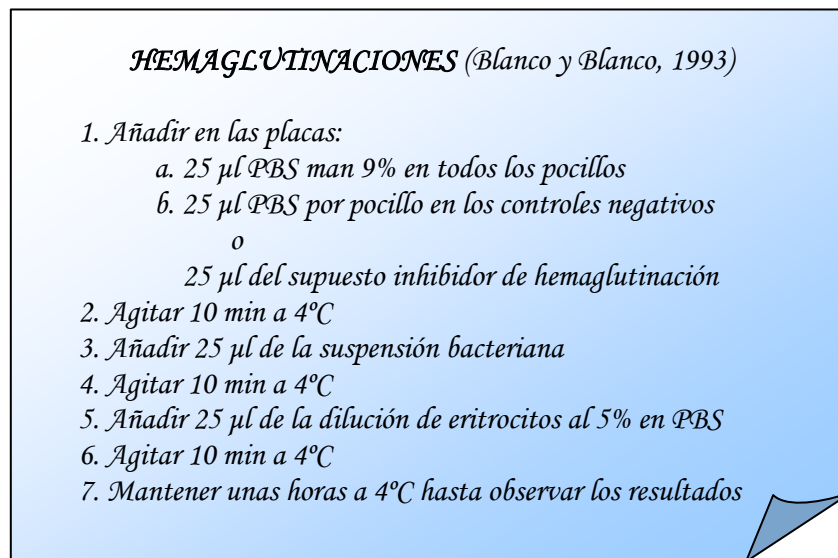


Figura 29. Protocolo de hemaglutinación.

2.10.2. ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN EN PLACA

Para estudiar la posible adhesión de las distintas cepas de *E. coli* a determinados compuestos de interés presentes en la leche de oveja utilizamos la técnica de adhesión en placa, que fue desarrollada hace algunos años y ha sido utilizada con numerosas especies bacterianas (Karlsson y Stromberg, 1987).

En primer lugar se depositó la muestra en una placa de HPTLC de aluminio en una cantidad aproximada de 4 μ g. Seguidamente se corrió la placa en el líquido de desarrollo correspondiente:

- Gangliósidos: C/M/H₂O 50:45:10 (v/v) conteniendo Cl₂Ca 0.02%
- Glicoesfingolípidos neutros: C/M/H₂O 60:35:8 (v/v)

-Oligosacáridos: butanol/etanol/H₂O/ácido acético/piridina 5:50:15:1.5:5 (v/v)

La placa se plastificó tal y como se ha descrito en el apartado 2.6.3.2.

Las bacterias se sembraron en placas Petri según lo descrito anteriormente y se incubaron toda la noche a 37° C. Al día siguiente se recogieron en 1 ml de PBS y se resuspendieron en la solución de bloqueo (BSA al 2% en PBS) hasta una densidad bacteriana de 1x10⁸ UFC/ml.

La placa se mantuvo en solución de bloqueo durante 1 h en agitación suave. Seguidamente se incubó durante 2 h con la solución bacteriana. Se lavó 4 veces durante 5 minutos con PBS y después se incubó durante 1 h con un anticuerpo contra *E. coli*. Se repitieron los lavados con PBS y se incubó entonces con un anticuerpo anti IgG biotinilado. Tras los lavados con PBS se realizó una última incubación con Estreptavidina-fosfatasa alcalina. Se realizaron los lavados con PBS y se reveló la placa con el sustrato FAST-BCIP. Se lavó con agua y se dejó secar (figura 30).

ADHESIÓN DE *E. coli* A Gg/GLN/OLIGOSACÁRIDOS

1. Depositar la muestra en una placa HPTLC de aluminio
2. Desarrollar la placa en el líquido apropiado
3. Plastificar con PIBMC 0.1%. Secar una h y plastificar los bordes con PIBMC 1%. Dejar secar toda la noche
4. Bloquear la placa con BSA al 2% en PBS durante 1 h en agitación suave
5. Incubar con la solución bacteriana durante 2 h en agitación
6. Lavar 4 veces con PBS
7. Incubar con anti-*E. coli* en dilución 1:75 en BSA 2% en PBS durante 1 h en agitación
8. Lavar 4 veces con PBS
9. Incubar con anti-IgG biotinilado en dilución 1:1000 en BSA 2% en PBS durante 1 h en agitación
10. Lavar 4 veces con PBS
11. Incubar con el complejo Estreptavidina-fosfatasa alcalina, en dilución 1:1000 en BSA 2% en PBS durante 1 h en agitación
12. Lavar 4 veces con PBS
13. Revelar con FAST-BCIP
14. Lavar con agua y secar

Figura 30. Protocolo de adhesión de *E. coli* a diferentes compuestos en placa.

3

Resultados y discusión

- 3.1. EXTRACTO SECO
- 3.2. GRASA
- 3.3. SIALOGLICOCONJUGADOS
 - 3.3.1. Estudio de los ácidos siálicos en cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados
 - 3.3.2. Tipos de ácidos siálicos
- 3.4. GANGLIÓSIDOS
 - 3.4.1. Cuantificación de los gangliósidos totales
 - 3.4.2. Separación e identificación de los gangliósidos individuales
 - 3.4.3. Inmunodetección de gangliósidos en placa
- 3.5. GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS
 - 3.5.1. Cuantificación de los glicoesfingolípidos neutros
 - 3.5.2. Separación, identificación y cuantificación de los glicoesfingolípidos neutros individuales
 - 3.5.3. Inmunodetección en placa
 - 3.5.4. Pruebas enzimáticas
 - 3.5.5. Estudio de los ácidos grasos
- 3.6. FOSFOLÍPIDOS
 - 3.6.1. Cuantificación de los fosfolípidos totales
 - 3.6.2. Separación e identificación de los fosfolípidos
 - 3.6.3. Cuantificación de los fosfolípidos individuales
 - 3.6.4. Estudio de los ácidos grasos de los fosfolípidos totales
 - 3.6.5. Estudio de los ácidos grasos de los fosfolípidos individuales
- 3.7. OLIGOSÁCARIDOS
- 3.8. ADHESIONES BACTERIANAS
 - 3.8.1. Ensayos de hemaglutinación
 - 3.8.2. Ensayos de inmunodetección en placa
- 3.9. RESUMEN

La composición general de la leche de oveja, incluyendo el contenido de proteínas, grasa, carbohidratos, iones, etc, se conoce desde hace mucho tiempo. Se conocen también los cambios en la composición debidos a la etapa de la lactación, la raza, la alimentación, la época del año, el número de partos, etc. Sin embargo, no se encuentran muchos datos en la bibliografía acerca del contenido de compuestos minoritarios como fosfolípidos, esfingolípidos, oligosacáridos y otros. Estos compuestos están adquiriendo en los últimos años una gran relevancia por su posible participación como factores nutricionales y funcionales.

Por todo lo expuesto anteriormente, decidimos llevar a cabo un estudio pormenorizado del contenido de fosfolípidos, glicoesfingolípidos y oligosacáridos de la leche de oveja. Además, se ha prestado una atención especial al contenido de ácidos siálicos y ácidos grasos de estos compuestos debido a su importante papel en numerosos procesos biológicos.

Algunos de los datos que se presentan en este trabajo se describen por primera vez en la leche de oveja por lo que no ha sido posible su comparación con otros datos similares de la bibliografía. Por ello, se ha hecho necesaria la comparación de los resultados con los obtenidos en la leche de otros rumiantes que, aunque cercanos filogenéticamente, presentan diferencias sustanciales. Como ejemplo ilustrativo podemos señalar la presencia de gangliósidos de la serie b en la leche de cabra que sin embargo no aparecen en la leche de vaca u oveja.

3.1. EXTRACTO SECO

Las muestras valoradas tienen un extracto seco que varía entre el 17.8% y el 18.8%, con un valor medio de $18.3 \pm 0.4\%$ expresado como gramos de extracto seco por 100 gramos de leche (p/p). Este dato sería equivalente al 18.9%, expresado como gramos de extracto seco por 100 ml de leche (p/v). El valor medio obtenido en nuestro estudio coincide con el recogido por el "Cuerpo Nacional Veterinario" para la leche producida por la raza Assaf (principal en nuestro trabajo) que es del 18.0%. Este dato también está en consonancia con los aportados por diferentes autores en varios estudios con leche de oveja.

La leche de oveja es más rica en grasa, proteínas y enzimas que la leche de vaca, lo que contribuye a que tenga un extracto seco mayor. *Juárez et al.* (1984) dan un valor del 17.9% para la leche de oveja y del 11.4% para la de vaca. *Ganguli* (1971)

recopila datos de varios autores que oscilan entre el 17.9% y el 20.7% para la leche de oveja.

También encontramos datos en la bibliografía que varían en función de la raza y del estado de la lactación. En cuanto a la raza, encontramos valores entre 16.4% y 20.0%. Observamos de nuevo que nuestro valor se encuentra dentro de este rango y destacamos que en la bibliografía encontramos un valor de 18.4% para la raza East-Friesian, lo cual es coherente con nuestros resultados ya que la raza de nuestro estudio procede de un cruce de East-Friesian con Awassi, como ya se describió anteriormente. En cuanto al estado de la lactación, se han encontrado algunos datos que sugieren un aumento del extracto seco en el transcurso de la lactación. Esto sería debido a que a lo largo de este proceso, el volumen de leche secretado disminuye, pero no los componentes que forman parte de ella. Para la raza Awassi se dan valores que varían entre el 14.0% y el 18.0% entre los meses 1 y 3 de lactación.

Comparando los valores del extracto seco de la leche de oveja con la de otros rumiantes, podemos observar que éste es superior al encontrado para la vaca por *Williams et al.* (1976), un 12.1% o al 11.4% aportado por *Juárez et al.* (1978). La leche de oveja también presenta un extracto seco algo superior al de la cabra, que varía entre 11.3-15.0% según un resumen de varios autores recogido por *Parkash and Jenness* (1968). El dato obtenido por *Prieto* (2004) para la leche de cabra es algo superior, 17.1%, bastante próximo al obtenido en el presente estudio para la leche de oveja.

3.2. GRASA

Las muestras de leche valoradas presentan unos porcentajes de grasa que oscilan entre el 7.1% y el 7.6%, con un valor medio de $7.2 \pm 0.2\%$, expresado como gramos de grasa en 100 gramos de leche. Este dato sería equivalente a 7.5% expresado como gramos de grasa en 100 ml de leche.

La grasa se encuentra en forma de glóbulos, que en la leche de oveja tienen un diámetro medio de 3.3 μm . La grasa es el constituyente de la leche de oveja con un rango de variación más amplio, sin embargo, tiene unas constantes físicas y químicas que permiten caracterizarla y diferenciarla de la leche de vaca.

Juárez et al. (1978) encuentran un valor de 7.5% para la leche de oveja. *Ganguli* (1971) describe un rango de variación del 5.3% al 8.3%. También se encuentran datos que oscilan dependiendo de la raza, desde 5.8% a 7.7% con un valor de 7.1% para la

East-Friesian. *Williams et al.* (1976) aportan valores de 7.8% a 8.4%. Éstos valores son superiores a los descritos para la leche de vaca, para la que este mismo autor da un valor de 3.5%. *Juárez et al.* (1978) aportaron un dato muy similar, 3.2%. La leche de oveja también supera a la leche de cabra en su contenido graso, ya que ésta última posee entre un 3.0% y un 5.5% (*Parkash and Jenness*, 1968).

3.3. SIALOGLICOCONJUGADOS

3.3.1. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES DE SIALOGLICOCONJUGADOS

3.3.1.1. Ácidos siálicos totales.

El valor de ácidos siálicos totales de nuestras muestras varía entre 193.5 y 221.1 mg/kg de leche, con un valor medio de 207.8 ± 10.4 mg/kg de leche, que equivaldría a 215.5 mg/l. No encontramos en la bibliografía muchos datos con los que poder comparar, ya que aunque varios autores han estudiado la leche de oveja, no hay muchos datos sobre los constituyentes minoritarios de ésta, tales como los gangliósidos y otros sialoglicoconjugados. A pesar de ello, existen algunas referencias. *Morrisey* (1973) apuntó un contenido en ácidos siálicos de 100 mg/l de leche fresca perteneciente al período de lactación media, valor que se corresponde prácticamente con la mitad del obtenido en el presente estudio. Estas diferencias pueden ser debidas al estado de lactación, pero no podemos excluir otros factores, tales como la raza, la alimentación, el ordeño o la metodología empleada en las determinaciones. En el trabajo de *Puente et al.* (1995) encontramos datos más parecidos a los nuestros, con un valor de 228.6 mg/kg en el día 60 de lactación.

Si comparamos los valores obtenidos para la leche de oveja con los recogidos en la bibliografía para otros rumiantes, aquellos son inferiores a los 302 mg/kg encontrados en cabra en un estudio anterior llevado a cabo por *Prieto* (2004). Un dato más cercano es el dado por *Puente et al.* (1996), de 229 a 242 mg/kg en leche de cabra de gran mezcla. Los valores obtenidos para la leche de oveja son ligeramente superiores al aportado para la leche de vaca por *Morrisey* (1973) y que se corresponde con 177 mg/l. Sin embargo, son ligeramente inferiores al encontrado por *Martín et al.* (2001) que es de 230 mg/kg. Con respecto a la leche humana, ésta presenta un valor

de 525.8 mg/l (*Martín-Sosa et al.*, 2004b), muy superior al obtenido para la leche de oveja.

3.3.1.2. Ácidos siálicos unidos a oligosacáridos.

El valor de ácidos siálicos unidos a oligosacáridos de las muestras de oveja estudiadas oscila entre 43.9 y 78.9 mg/kg, con un valor medio de 57.3 ± 14.5 mg/kg, que equivaldría a 59.3 mg/l (tabla 14 y figura 31).

Tabla 14. Contenido de ácidos siálicos en cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados (mg/kg).

| | ASO | ASG | ASC | ASL |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | 57.3±14.5 | 120.1±9.4 | 30.5±4.4 | 30.0±0.9 |
| AS/AST¹ | 27.4 | 58.0 | 14.5 | 15.2 |

Los datos representan la media de seis determinaciones.

¹Los valores representan el porcentaje de los ácidos siálicos de cada fracción con respecto al contenido total de ácidos siálicos de las muestras.

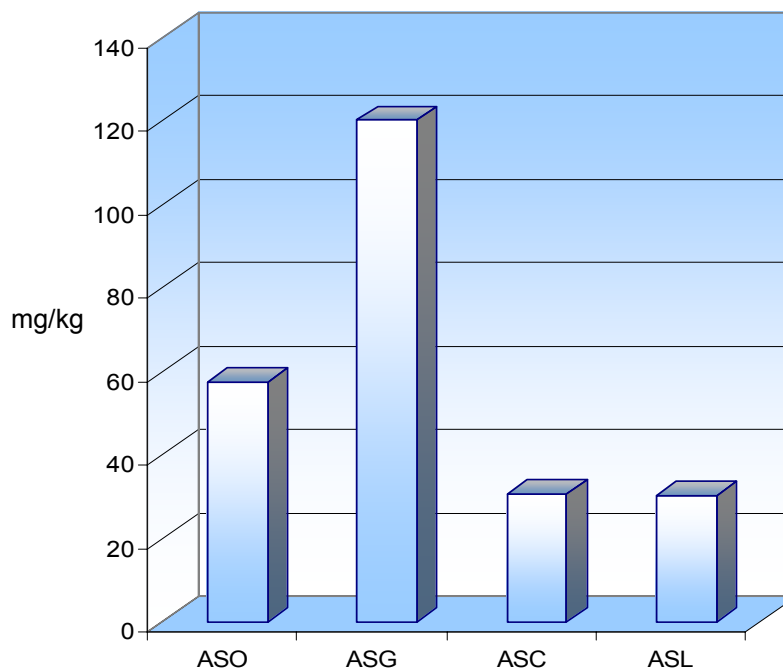


Figura 31. Contenido de ácidos siálicos en cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados.

En la bibliografía no encontramos ningún estudio sobre la composición de la leche de oveja que refleje el contenido en ácidos siálicos unidos a oligosacáridos. Teniendo en cuenta que la cabra es un animal cercano a la oveja, sí podemos comparar estos datos con los obtenidos para la leche de cabra en el trabajo de *Prieto* (2004). La cabra tiene un valor medio de ácidos siálicos unidos a oligosacáridos de 103 mg/kg, valor absoluto superior al de la oveja; pero el porcentaje de ácidos siálicos unidos a oligosacáridos con respecto a los ácidos siálicos totales es de 34.4%, valor no muy diferente al obtenido en el presente estudio para la leche de oveja, que es de 27.4%.

También encontramos datos acerca del contenido en ácidos siálicos unidos a oligosacáridos de la leche de vaca y humana. La leche de oveja se encuentra en una situación intermedia con respecto a las dos anteriores. Su contenido es superior al de la leche de vaca, para la que se han dado valores de 14 mg/l (*Carlson*, 1985), 32.5 mg/kg (*Martín et al.*, 2001) y 33 mg/kg (*Martín-Sosa et al.*, 2003). Sin embargo, la leche de oveja presenta valores muy inferiores a los obtenidos para la leche humana, para la cual *Martín-Sosa et al.* (2003) dan un valor de 365 mg/kg y estos mismos autores en un trabajo posterior (*Martín-Sosa et al.*, 2004b) aportan un dato de 411.2 mg/l.

La leche humana tiene un alto contenido de oligosacáridos, de 12 a 14 g/l en leche madura, siendo los valores en calostro de 20 a 23 g/l (*Coppa et al.*, 1999). La leche de vaca tiene un contenido bastante inferior, de 0.7 a 1.2 g/l en calostro (*Veh et al.*, 1981). En la leche humana se han aislado más de 130 oligosacáridos complejos mientras que en un estudio de *Gopal and Gill* (2000) se han descrito 10 oligosacáridos sialilados y 8 neutros en leche bovina y calostro. Se considera que la leche humana es la única con éste elevado contenido en oligosacáridos complejos fucosilados y sialilados (*Kunz et al.*, 1999).

El calostro de oveja contiene oligosacáridos neutros α 3'-, β 3'- y β 6'-galactosillactosa, muy poco abundantes en la leche humana y de vaca y 3'-sialillactosa (NeuAc) y 3'- y 6'-sialillactosa conteniendo NeuGc más habituales en la citadas leches (*Urashima et al.*, 1989 y 2001; *Nakamura et al.*, 1998). Este contenido es más parecido al del calostro de cabra que al humano o de vaca. No se han encontrado datos en la bibliografía acerca del contenido de oligosacáridos de la leche madura de oveja.

La cantidad de lactosa de la leche de oveja es muy similar a la de vaca, en torno al 4,3% (*Juárez et al.*, 1984) y 4.4% (*Juárez et al.*, 1978) respectivamente, pero inferior a la de la leche humana, que es del 6.5% aproximadamente. Precisamente el hecho de que la leche humana contenga mayor cantidad de lactosa podría ser responsable

de la presencia de más ácidos siálicos unidos a oligosacáridos en este tipo de leche. La lactosa podría actuar como precursor de diferentes oligosacáridos que posteriormente serían sialilados mediante las sialiltransferasas.

El porcentaje relativo de ácidos siálicos unidos a oligosacáridos con respecto a los ácidos siálicos totales es del 27.4%. Como era de esperar es un dato intermedio entre el de vaca, 9% (*Carlson, 1985*) y el de leche humana, 80% (*Martín-Sosa et al., 2004b*), y muy parecido al de la leche de cabra, 34.4% (*Prieto, 2004*).

3.3.1.3. Ácidos siálicos unidos a glicoproteínas.

Los valores de ácidos siálicos unidos a glicoproteínas oscilan entre 102.2 y 128.1 mg/kg, con un valor medio de 120.1 ± 9.4 mg/kg, que equivaldría a 124.4 mg/l (tabla 14 y figura 31).

Al igual que ocurre con los ácidos siálicos unidos a oligosacáridos, tampoco encontramos en la bibliografía datos correspondientes a la leche de oveja con respecto a estos componentes. Si comparamos con los datos obtenidos para la leche de cabra en el trabajo de *Prieto (2004)*, la cabra tiene un valor medio de 187 mg/kg, valor algo superior al obtenido para la oveja.

Comparando los valores obtenidos para la leche de oveja con los de leche de vaca y humana, observamos que nuestros datos son bastante similares a los de la vaca, 146 mg/l (*Carlson, 1985*), 95-139 mg/l (*Nesser et al., 1991*) y 132-148 mg/kg (*Martín et al., 2001*). Con respecto a la leche humana, la leche de oveja presenta valores superiores, siendo en la primera de 72.8 mg/l (*Martín-Sosa et al., 2004b*), 73 mg/l (*Carlson, 1985*) y 89.6 mg/l (*Wang et al., 2001*).

Si analizamos el porcentaje que suponen los ácidos siálicos unidos a glicoproteínas con respecto a los ácidos siálicos totales, vemos que varía entre el 48.3 y 62.1%, con un valor medio de 58.0%, valor similar al de cabra (61.7%), como se describió anteriormente. Para la leche de vaca encontramos valores superiores, del 91.0% (*Carlson, 1985*), 72.0% (*Nesser et al., 1991*) y 80.0% (*Martín et al., 2001*). Para la leche humana se han descrito valores desde 12.0-14.0% (*Martín-Sosa et al., 2004b*) hasta el 35.0% (*Carlson, 1985*). El contenido en proteínas de la leche humana es muy bajo, lo que explica que también el contenido en glicoproteínas sea menor.

3.3.1.4. Ácidos siálicos unidos a caseínas.

En la leche de oveja, la caseína representa alrededor del 80.0% de las proteínas totales. A nosotros nos interesa la κ -caseína, ya que es la única fracción de la caseína que contiene ácidos siálicos (*Jollès and Fiat, 1979*). Por tanto, los resultados obtenidos son ácidos siálicos unidos a κ -caseína, aunque hablemos de caseína en general. Esta fracción representa un porcentaje de 7.3% en oveja, 8.1% en cabra y 9.4% en vaca (*Assenat, 1991*).

Se conoce tanto la secuencia completa de aminoácidos de la κ -caseína ovina, como su contenido en monosacáridos. Se han descrito tres sitios de unión para cadenas glucídicas en tres residuos distintos de treonina, y dos sitios de fosforilación en serinas (*Moreno et al., 2000*).

El caseinomacropéptido (CMP), también llamado glicomacropéptido (GMP), se produce por hidrólisis de la κ -caseína por la acción de la quimosina y contiene todos los carbohidratos de la κ -caseína. Es uno de los componentes del suero de la leche que se obtiene como subproducto en las industrias queseras y se le ha relacionado en los últimos años con numerosas actividades biológicas (unión de enterotoxinas, modulación de la respuesta inmune, etc) (*Miguel et al., 2007*). Los principales componentes del CMP ovino corresponden a especies asialo-aglicó. La baja proporción de glicosilación de las especies de CMP ovino encontrados por *Moreno et al. (2000)* corrobora los descubrimientos previos del bajo contenido glucídico y de ácidos siálicos de la κ -caseína ovina. La fracción oligosacáridica del CMP ovino está compuesta por GalNAc, Gal y ácidos siálicos, principalmente NeuGc.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente analizamos los datos obtenidos en el presente estudio. Los valores de ácidos siálicos unidos a caseína oscilan entre 24.1 y 36.3 mg/kg con un valor medio de 30.5 ± 4.4 mg/kg, lo que sería equivalente a 31.6 mg/l (tabla 14 y figura 31). El único dato encontrado en la bibliografía para la leche de oveja es de 84 mg/l (*Morrisey 1973*), que sería el doble del obtenido en el presente estudio.

Si comparamos los valores absolutos de nuestro estudio, 30.5 mg/kg, con los obtenidos para la cabra en el trabajo de *Prieto (2004)*, 110.5 mg/kg, vemos que son mucho más bajos. En otros trabajos en leche de cabra se dan valores más similares a los de oveja como los 32-37 mg/l de *Zittle and Custer (1966)* o los 28 mg/l de *Morrisey (1973)*. La leche de oveja tiene también un contenido mucho menor que la leche de vaca, con valores de 120-169 mg/l (*Morrisey, 1973*) u 80.2 mg/kg (*Martín et al., 2001*).

En leche humana se encontraron 17.3 mg/l (*Martín-Sosa et al.*, 2004b); ésto se debe probablemente a que en la leche humana la cantidad de caseína es más baja.

El porcentaje relativo de ácidos siálicos unidos a caseína respecto de los ácidos siálicos de las glicoproteínas varía entre un 19.5% y un 33.1%, con un valor medio del 25.6%, mucho menor que el de cabra que es de aproximadamente un 79% (*Prieto*, 2004) y que el de vaca, un 48.8% (*Martín et al.*, 2001) y similar al de la leche humana (*Martín-Sosa et al.*, 2004b), un 23.8%.

Teniendo en cuenta los porcentajes relativos de los ácidos siálicos unidos a caseína respecto de los ácidos siálicos totales, nuestros valores oscilan entre el 12.1% y 16.9%, con un valor medio de 14.5%, inferior al de la leche de cabra, 36.4% (*Prieto*, 2004) y de vaca, 48,8% (*Martín et al.*, 2001) y 36.1% (*Morrisey*, 1973). En leche humana la fracción caseínica contiene tan sólo el 3.3% del total de los ácidos siálicos (*Martín-Sosa et al.*, 2004b).

Si tenemos en cuenta lo descrito anteriormente, es lógico que obtengamos menos ácidos siálicos unidos a caseína, ya que la leche de oveja tiene menos κ -caseína que la de otros rumiantes y además está poco sialilada.

3.3.1.5. Ácidos siálicos libres.

Hemos valorado también la cantidad de ácidos siálicos libres presentes en algunas de nuestras muestras. Teniendo en cuenta la baja cantidad de ácidos siálicos libres encontrados en la leche de cabra (*Prieto*, 2004), entre 2.4-4.7 mg/l, y esperando encontrar valores similares en la leche de oveja, nos sorprendió comprobar que ésta presenta una cantidad de ácidos siálicos libres bastante superior a la de cabra, con valores que oscilan entre 29.6 y 31.3 mg/kg, con un valor medio de 30.3 ± 0.9 mg/kg, equivalente a 31.4 mg/l (tabla 14 y figura 31). Este valor representa un 15.2% de los ácidos siálicos totales, frente al 1.0% que representan en la cabra.

En la leche de vaca se han encontrado cantidades más parecidas, 26-27 mg/l, lo que supone un 12-16% del total (*Martín et al.*, 2001). En leche humana se han encontrado valores más bajos, de 7-16 mg/l, un 2.0-3.5% del total (*Martín-Sosa et al.*, 2004b) o 9 mg/l, un 2.9% (*Wang et al.*, 2001).

No se conoce mucho acerca de la procedencia y función de los ácidos siálicos libres en la leche, pero es posible que no todos los ácidos siálicos libres sean componentes endógenos de ésta, y que una parte de ellos se forme a partir de los sialoglicoconjugados por acción de enzimas bacterianas (*Martín et al.*, 2001). Por el contrario, otros autores no consideran que los ácidos siálicos libres aumenten a

expensas de las otras formas de ácidos siálicos, sino que proponen que los ácidos siálicos libres puedan ser el reflejo del estado metabólico de los ácidos siálicos de la glándula mamaria o una reserva de ácidos siálicos, ya que su concentración disminuye paralelamente a la de ácidos siálicos unidos a glicoproteínas y a oligosacáridos (Wang *et al.*, 2001).

El porcentaje relativo de los ácidos siálicos contenidos en cada fracción con respecto a los ácidos siálicos totales se muestra en la tabla 14 y en la figura 32.

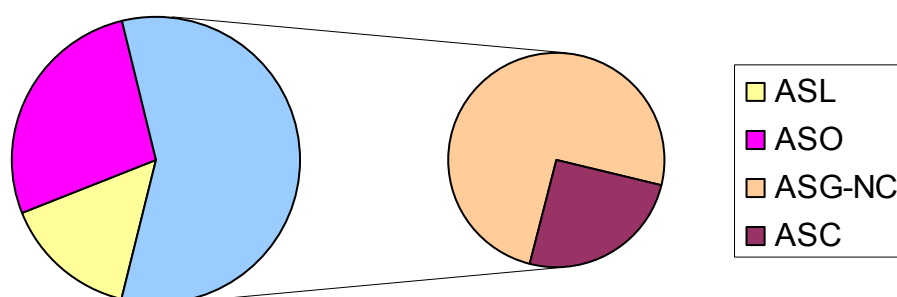


Figura 32. Porcentaje relativo del contenido de ácidos siálicos en cada fracción con respecto al total. ASL: ácidos siálicos libres; ASO: ácidos siálicos unidos a oligosacáridos; ASG-NC: ácidos siálicos unidos a glicoproteínas no caseínas; ASC: ácidos siálicos unidos a caseínas.

3.3.2. TIPOS DE ÁCIDOS SIÁLICOS

Para determinar los distintos tipos de ácidos siálicos presentes en cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados de la leche de oveja, sometimos a cada una de estas fracciones a una HPTLC. Después analizamos las placas densitométricamente tras revelarlas con el reactivo del resorcinol. Los densitogramas obtenidos nos permitieron comparar las proporciones relativas de cada uno de ellos.

Al analizar las placas observamos tres bandas y comparados sus R_f con los de los ácidos siálicos del patrón podemos deducir que se corresponden con el ácido *N*-glicolil neuramínico (NeuGc), ácido *N*-acetil neuramínico (NeuAc) y ácido 7-*O*-acetil *N*-acetil neuramínico (7-*O*-acetil NeuAc) (figura 33). En la figura 34 se muestran los densitogramas correspondientes a cada fracción de sialoglicoconjugados.

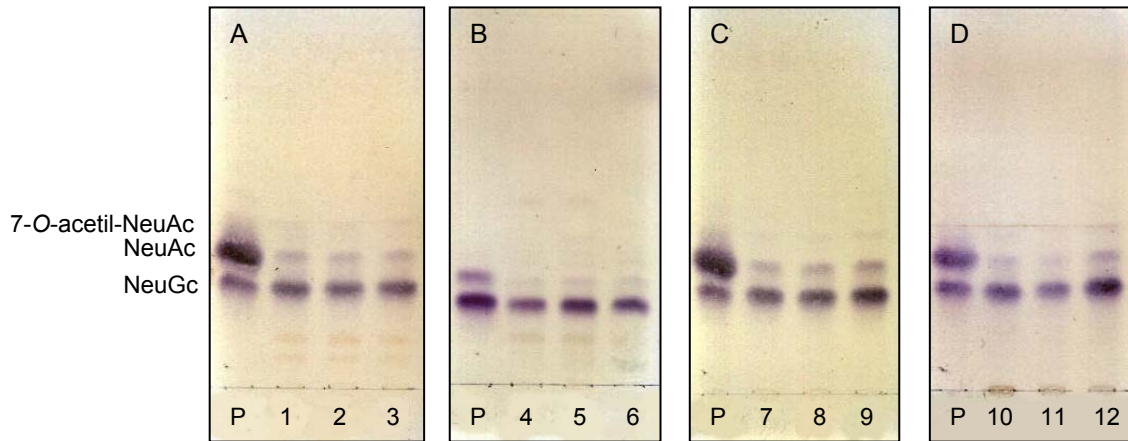


Figura 33. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de los ácidos siálicos de las diferentes fracciones de oligosacáridos.

- A. Ácidos siálicos totales
- B. Ácidos siálicos unidos a oligosacáridos
- C. Ácidos siálicos unidos a glicoproteínas
- D. Ácidos siálicos unidos a caseínas

P, Patrón de ácidos siálicos

1-3, Muestras de ácidos siálicos totales

4-6, Muestras de ácidos siálicos unidos a oligosacáridos

7-9, Muestras de ácidos siálicos unidos a glicoproteínas

10-12, Muestras de ácidos siálicos unidos a caseína

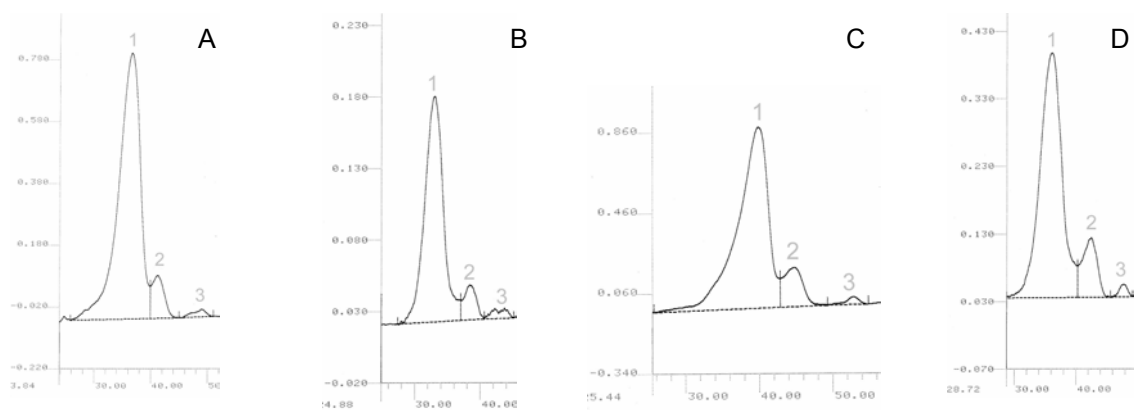


Figura 34. Densitogramas correspondientes a las diferentes fracciones de sialoglicoconjugados.

- A. Ácidos siálicos totales
 - B. Ácidos siálicos unidos a oligosacáridos
 - C. Ácidos siálicos unidos a glicoproteínas
 - D. Ácidos siálicos unidos a caseínas
- 1, NeuGc; 2, NeuAc; 3, 7-O-acetil NeuAc

Los datos obtenidos en nuestro estudio son muy parecidos en todas las fracciones estudiadas, con valores que oscilan entre 70.5 y 76.0% para NeuGc, 17.2 y 26.2% para NeuAc y 3.1 y 6.8% para 7-O-acetil NeuAc y con valores medios de $73.7 \pm 2.7\%$ para NeuGc, $21.9 \pm 4.2\%$ para NeuAc y $4.5 \pm 1.7\%$ para 7-O-acetil NeuAc. Los datos se representan en la tabla 15 y en la figura 35. Estos resultados han sido corregidos de acuerdo a los datos proporcionados por *Svennerholm* (1958), quien indicó que el coeficiente de absorción molar del NeuGc es un 15% más elevado que el del NeuAc. Dado que la valoración ha sido realizada por densitometría sobre HPTLC en la que estaban presentes los dos tipos de ácidos siálicos y a pesar de ser la variación pequeña, juzgamos conveniente esta corrección.

Tabla 15. Contenido de los distintos ácidos siálicos en cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados (%).

| | NeuGc | NeuAc | 7-O-acetil NeuAc |
|--------------|----------------|----------------|------------------|
| AST | 75.8 \pm 2.8 | 19.7 \pm 2.2 | 4.6 \pm 0.9 |
| ASO | 76.0 \pm 1.4 | 17.2 \pm 1.0 | 6.8 \pm 0.6 |
| ASG | 70.5 \pm 4.0 | 26.2 \pm 3.3 | 3.3 \pm 0.9 |
| ASC | 72.5 \pm 1.8 | 24.4 \pm 1.3 | 3.1 \pm 0.5 |
| Media | 73.7 \pm 2.7 | 21.9 \pm 4.2 | 4.5 \pm 1.7 |

Los datos representan la media de seis determinaciones de cada muestra.

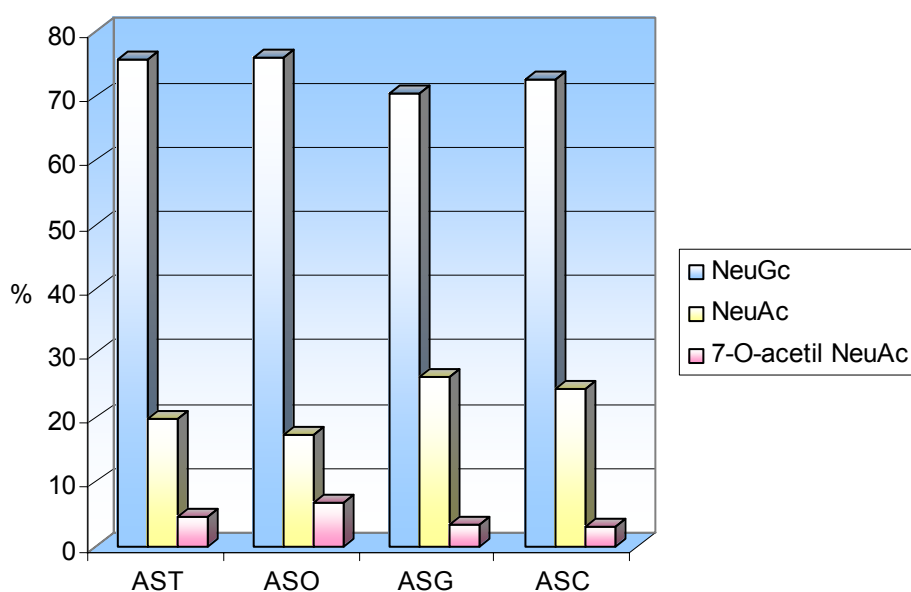


Figura 35. Contenido de los distintos ácidos siálicos en cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados.

Los datos obtenidos están en consonancia con los descritos por *Puente et al.* (1995) para la leche de oveja, quienes señalan que la proporción de NeuGc con respecto a los ácidos siálicos totales es del 63.0-83.0%. Por tanto, la leche de oveja tiene un elevado porcentaje de NeuGc, ligeramente superior al encontrado en la cabra por *Prieto* (2004) que es de 68.7%; *Puente et al.* (1994) describieron para la cabra un 30.0-60.0% de NeuGc. *Puente and Hueso* (1993) encontraron un 6.0-32.0% de NeuGc en leche de vaca, un contenido muy inferior al de la oveja. En la leche humana no aparece NeuGc, aunque sí una banda correspondiente al 7-O-acetil NeuAc (*Martín-Sosa et al.*, 2004b). Teniendo en cuenta todos los datos expuestos, es evidente que la oveja, y también la cabra, tienen contenidos de NeuGc más elevados que otros rumiantes.

3.4. GANGLIÓSIDOS

3.4.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS GANGLIÓSIDOS TOTALES

Los gangliósidos fueron valorados como ácidos siálicos unidos a lípidos. Hemos encontrado valores que oscilan entre 347.1 y 642 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con un valor medio de $478.2 \pm 100.8 \mu\text{g}/\text{kg}$, valor equivalente a 495.2 $\mu\text{g}/\text{l}$ de leche. Este valor es muy superior al único dato encontrado en la bibliografía sobre el contenido de gangliósidos de la leche de oveja. *Puente et al.* (1995) encontraron unos 126.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Las diferencias encontradas pueden deberse a que estas muestras procedían de ovejas de la raza Castellana-Awassi.

Si comparamos la cantidad de gangliósidos de la leche de oveja con la de otras especies, encontramos que tiene un contenido mayor que la de cabra, con 225.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de leche (*Prieto*, 2004) y 150-190 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Puente et al.*, 1994), pero menor que la leche de vaca y humana, con valores de unos 0.9 mg/kg (*Martín et al.*, 2001) y 0.83 mg/l (*Martín-Sosa et al.*, 2004b), respectivamente.

3.4.2. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS GANGLIÓSIDOS INDIVIDUALES

Tras la obtención de los gangliósidos, se llevó a cabo su separación mediante HPTLC. Los gangliósidos individuales se identificaron por comparación de su

movilidad relativa (Rf) con la de gangliósidos conocidos de cerebro bovino y de leche de vaca. La figura 36 muestra una placa de HPTLC de una de las muestras de gangliósidos. La cuantificación de los gangliósidos se llevó a cabo por densitometría. La figura 37 presenta un densitograma correspondiente al desarrollo cromatográfico de una de las muestras.

Figura 36. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de los gangliósidos.

1. Patrón de gangliósidos de cerebro bovino
2. Extracto crudo de gangliósidos
3. Gangliósidos purificados a través de Sep-Pak

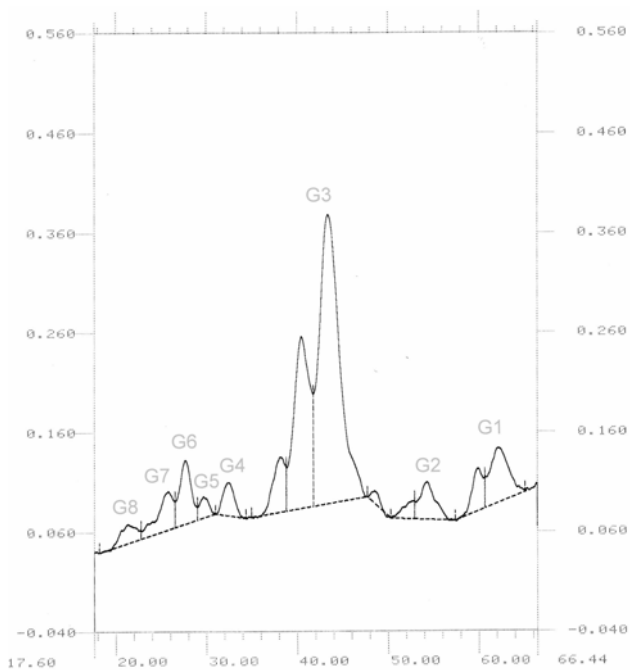
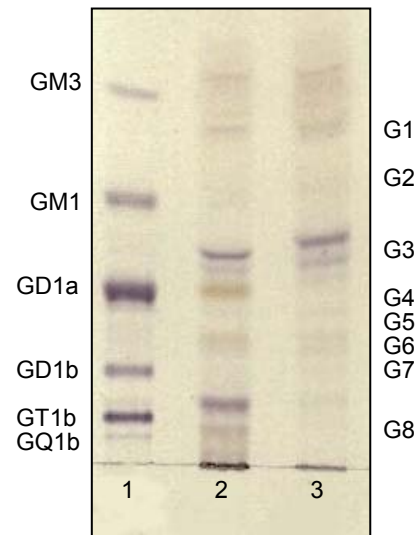


Figura 37. Densitograma obtenido a partir de una HPTLC de gangliósidos.

Se han encontrado ocho gangliósidos diferentes, denominados de G1 a G8 en orden decreciente de su movilidad cromatográfica (de menor a mayor polaridad). En la tabla 16 se recoge la distribución porcentual de cada uno de los gangliósidos individuales en las diferentes muestras.

Tabla 16. Contenido de los diferentes gangliósidos individuales en cada una de las muestras.

| | % |
|-----------|-----------|
| G1 | 20.8±9.8 |
| G2 | 4.3±0.8 |
| G3 | 62.0±10.9 |
| G4 | 3.3±1.9 |
| G5 | 1.8±1.2 |
| G6 | 3.7±1.6 |
| G7 | 2.0±1.7 |
| G8 | 2.2±1.3 |

Los datos representan la media de seis determinaciones.

El gangliósido mayoritario en las muestras es G3, con un porcentaje del 62.0%, seguido por G1, con un 20.8%. Entre los dos suman el 82.8% de los gangliósidos totales. Estos gangliósidos han sido identificados como GM3 (G1) y GD3 (G3) de acuerdo con su movilidad cromatográfica. El único dato que encontramos en la bibliografía sobre los gangliósidos de la leche de oveja refleja unos resultados muy distintos a los obtenidos en el presente estudio. *Puente et al.* (1995) describen que el gangliósido mayoritario en leche de oveja es GM3 (aproximadamente el 80.0-90.0% de los ácidos siálicos unidos a lípidos), y que sólo existe una pequeña cantidad de GD3. Quizás estas diferencias sean debidas a los procesos experimentales y nos parece lógico pensar que GD3 sea el gangliósido mayoritario en leche de oveja, ya que así ha sido descrito en otros rumiantes como la cabra, para la que *Prieto* (2004) aporta un dato del 64.1%, muy similar al obtenido en el presente estudio. También *Puente et al.* (1994) describieron GD3 como gangliósido mayoritario en la leche de cabra. Lo mismo ocurre con la leche de vaca (*Puente et al.*, 1992).

Se ha descrito una disminución del contenido de gangliósidos a lo largo de la lactación, siendo este contenido bastante más elevado en el calostro que en la leche

madura. La leche de algunos rumiantes, oveja, cabra y vaca, tiene GD3 como gangliósido mayoritario, mientras que en la leche humana es GM3 el más abundante. En la leche humana se ha encontrado una relación inversa entre GM3 y GD3. En calostro, GD3 es el gangliósido mayoritario, pero su contenido disminuye a lo largo de la lactación a la vez que aumenta GM3, siendo éste el más abundante en la leche madura (*Martín-Sosa et al.*, 2004a).

El gangliósido GM3 aparece en nuestras placas de cromatografía como una doble banda que queda reflejada en el densitograma como dos picos superpuestos. Las dos bandas corresponden a formas distintas de GM3, que se diferencian en la composición de su ceramida, lo que da una diferente solubilidad en el líquido de desarrollo.

El gangliósido GD3 aparece como varias bandas, al menos tres, como se puede observar en el densitograma. 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 NeuAc o NeuGc, o ambos a la vez. Ésto ya fue descrito por *Martín et al.* (2001) para la leche de vaca.

El resto de los gangliósidos presentan porcentajes mucho menores y se han identificado de la siguiente forma: G2 como O-acetil GD3, G4 como O-Acetil GT3, G5 como GT3, G7 como GD1b y G8 como GT1b. G6 no ha podido ser identificado.

La figura 38 resume las proporciones de los diferentes gangliósidos individuales.

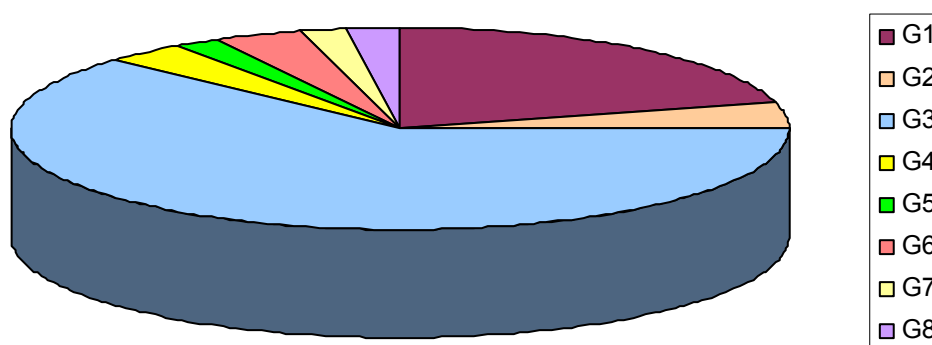


Figura 38. Distribución de cada uno de los gangliósidos individuales en la leche de oveja.

3.4.3. INMUNODETECCIÓN DE GANGLIÓSIDOS EN PLACA

Después de identificar los gangliósidos en base a su movilidad cromatográfica se llevó a cabo su detección mediante anticuerpos monoclonales como ya se describió en el apartado 2.6.3.2. Se utilizaron varios anticuerpos para la detección de diferentes gangliósidos. A continuación se irán detallando uno a uno los diferentes anticuerpos utilizados y los resultados obtenidos. Para cada anticuerpo se mostrarán dos placas de HPTLC de aluminio, cada una de ellas con un depósito de gangliósidos de leche de oveja. En cada caso, ambas placas se desarrollaron conjuntamente según el protocolo descrito anteriormente y se revelaron por separado. A la izquierda de cada imagen aparece el revelado químico con orcinol (A) y a la derecha el inmunológico (B).

↳ GD3

El anticuerpo R24 se une a dos especies de GD3, la que tiene dos NeuAc y la que tiene un NeuGc en posición externa, pero no se une a las que tienen dos NeuGc o un NeuGc en posición interna (*Tai et al.*, 1988).

En la figura 39 podemos observar claramente las dos bandas correspondientes al GD3 (señaladas con la flecha verde). De esta forma se confirma que el gangliósido denominado previamente como G3 se trata de GD3.

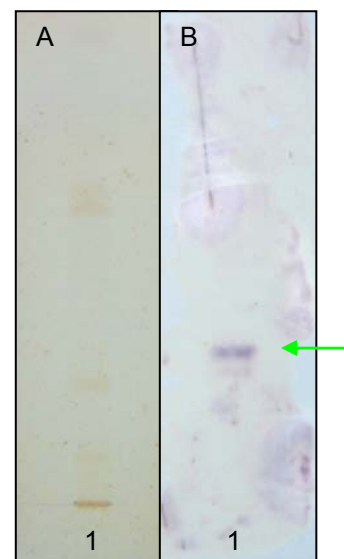


Figura 39. Inmunodetección con R24.
A. Revelado químico
B. Revelado inmunológico
1. Gangliósidos de leche de oveja

↪ O-Acetil-GD3

En un principio se describió que el anticuerpo JONES se unía a dos o tres gangliósidos que migran entre el GD1a y el GM2 en placas de HPTLC cuando se utilizaba el líquido de desarrollo descrito en el protocolo de inmunodetección (*Schlosshauer et al.*, 1988). Posteriormente se comprobó su especificidad para el O-acetil-GD3 (*Blum and Barnstable*, 1987), aunque parece que también se puede unir a O-acetil-GT3.

En la figura 40 observamos una doble banda correspondiente al O-acetil-GD3. Ésta es apenas perceptible en el revelado químico. Se confirma que el gangliósido denominado previamente G2 es O-acetil-GD3.

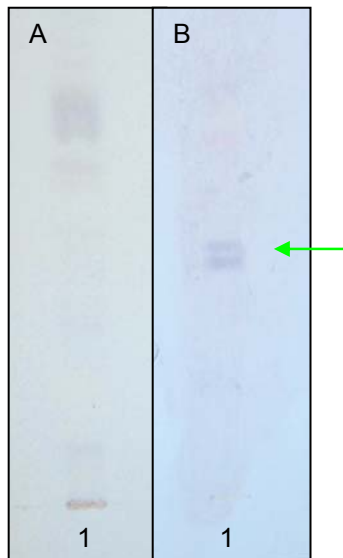


Figura 40. Inmunodetección con JONES

- A. Revelado químico
- B. Revelado inmunológico
- 1. Gangliósidos de leche de oveja

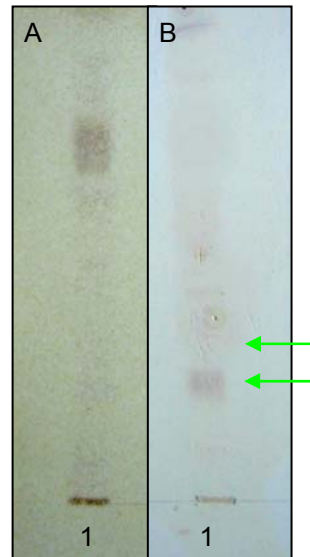
↪ Gangliósidos polisialilados

El anticuerpo A2B5 reacciona con una serie de gangliósidos de la serie c (GT1c, GQ1c, GP1c) (*Saito and Sugiyama*, 2000), GT3 y O-acetil-GT3 (*Dubois et al.*, 1990). Se ha descrito también su reactividad con GD3 (*Moreno et al.*, 1998).

En la figura 41 podemos observar una banda muy marcada correspondiente al gangliósido GT3, denominado anteriormente G5. Por encima de esta aparece otra banda muy tenue, apenas perceptible perteneciente al gangliósido O-acetil-GT3,

identificado previamente como G4. Por último podemos observar, por encima del O-acetil-GT3, una tercera banda que se correspondería con el GD3.

Figura 41. Inmunodetección con A2B5
 A. Revelado químico
 B. Revelado inmunológico
 1. Gangliósidos de leche de oveja



↳ GM3-NeuGc

El anticuerpo 14F7 reconoce específicamente la estructura del GM3-NeuGc (Carr *et al.*, 2000).

En la figura 42 podemos observar claramente la doble banda de GM3-NeuGc, que migra a la altura del gangliósido identificado anteriormente como G1.

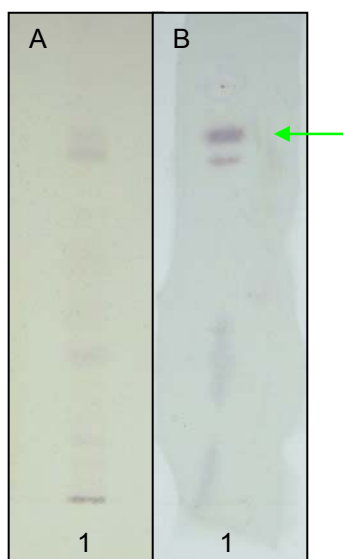


Figura 42. Inmunodetección con 14F7.
 A. Revelado químico
 B. Revelado inmunológico
 1. Gangliósidos de leche de oveja

↪ Gangliósidos-NeuGc

Existen muy pocos anticuerpos que reconozcan NeuGc. El P3 es específico de gangliósidos con NeuGc y también reconoce los sulfátidos (*Vázquez et al.*, 1995).

En la figura 43-B podemos observar varias bandas correspondientes a diferentes gangliósidos que contienen NeuGc. Teniendo en cuenta su movilidad cromatográfica podríamos decir que estas bandan corresponden a GM3, GD3, O-acetil-GT3 y GT3.

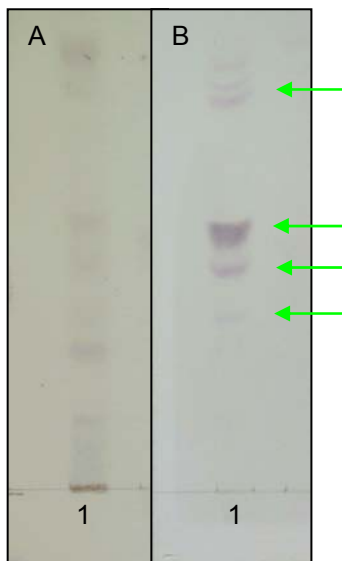


Figura 43. Inmunodetección con P3.

- A. Revelado químico
- B. Revelado inmunológico
- 1. Gangliósidos de leche de oveja

↪ GD1a, GD1b, GT1b, GM1 y GM2

Anteriormente habíamos especulado que G7 podría ser el gangliósido GD1b y G8 podría corresponderse con el gangliósido GT1b. Para poder corroborar nuestras suposiciones decidimos probar los anticuerpos frente a ambos gangliósidos, pero los resultados fueron negativos. Parece que la leche de oveja, al igual que la de vaca y la humana, no tiene ni GD1b, ni GT1b. Sin embargo, en un trabajo reciente *Iwamori et al.* (2008) han encontrado que estos dos gangliósidos sí están presentes en la leche de cabra.

Por último hicimos varias pruebas con anticuerpos frente a GD1a, GM1 y GM2. Todas ellas resultaron negativas.

Es muy difícil por tanto precisar cuales son los gangliósidos complejos presentes en la leche de oveja que quedan sin identificar, ya que como podemos comprobar buscando en la bibliografía, el perfil de gangliósidos en las diferentes leches, es distinto, a pesar de la proximidad entre especies.

En resumen, analizando de forma conjunta los resultados obtenidos tanto en la identificación de los gangliósidos por comparación de su movilidad relativa con la de gangliósidos patrón, como en la detección con anticuerpos monoclonales, podemos concluir que de los ocho gangliósidos encontrados se han identificado cinco: G1 como GM3, G2 como O-acetil-GD3, G3 como GD3, G4 como O-acetil-GT3 y G5 como GT3. Con el uso de los anticuerpos monoclonales pudimos comprobar que G7 y G8 no correspondían a GD1b y GT1b, como se había especulado en un primer momento. Por tanto, G6, G7 y G8 quedaron sin identificar.

3.5. GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS

3.5.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS

La cuantificación de los glicosfingolípidos neutros se llevó a cabo por densitometría como se describe en el apartado 2.7.2.1. El valor obtenido para los glicosfingolípidos neutros en la leche de oveja fue de 9.6 ± 1.2 mg/kg de leche, equivalente a 9.7 ± 1.2 mg/l de leche. En la bibliografía no existe ningún dato que haga referencia a la cantidad de glicosfingolípidos neutros de la leche de oveja. El dato obtenido en nuestro estudio es algo superior al obtenido por *Sánchez-Juanes (2007)* para la leche de vaca, que fue de 7.1 mg/l.

3.5.2. SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS INDIVIDUALES

Tras la obtención de los glicosfingolípidos neutros, se llevó a cabo su separación mediante HPTLC. Los glicosfingolípidos neutros individuales se identificaron por comparación de su movilidad relativa (Rf) con la de un patrón de glicosfingolípidos neutros conocidos. En la figura 44 se puede ver una placa de HPTLC con una muestra de glicosfingolípidos neutros de leche de oveja. La cuantificación de los glicosfingolípidos neutros se llevó a cabo por densitometría. La

figura 45 presenta un densitograma correspondiente al desarrollo cromatográfico de una de las muestras.

Figura 44. Cromatografía en capa fina (HPTLC) de glicosfingolípidos neutros.

1. Patrón de glicosfingolípidos neutros (GalCer, LacCer, Gb3 y Gb4)
2. Muestra de glicosfingolípidos neutros de leche de oveja
3. Patrón de GlcCer

GlcCer: glucosilceramida; GalCer: galactosilceramida;
LacCer: lactosilceramida; Gb3: globotriaosilceramida, Gb4:
globotetraosilceramida ó globósido.

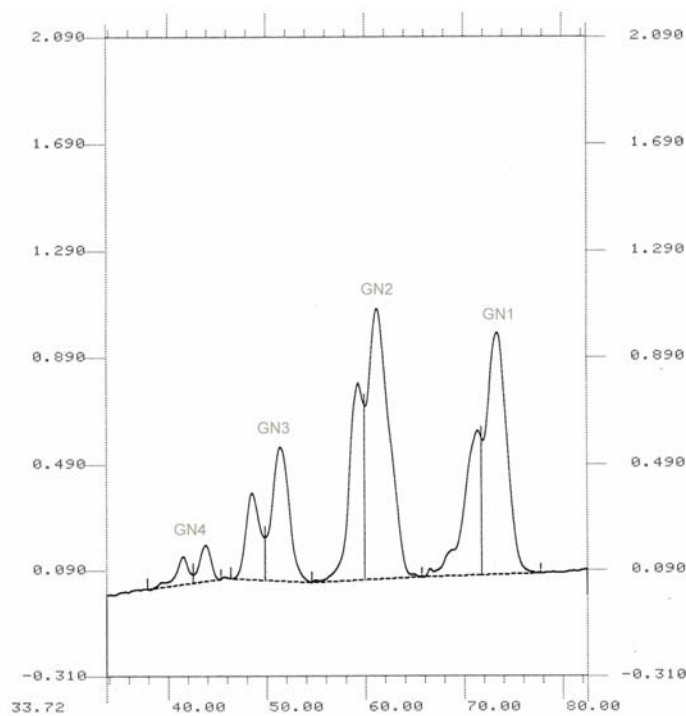
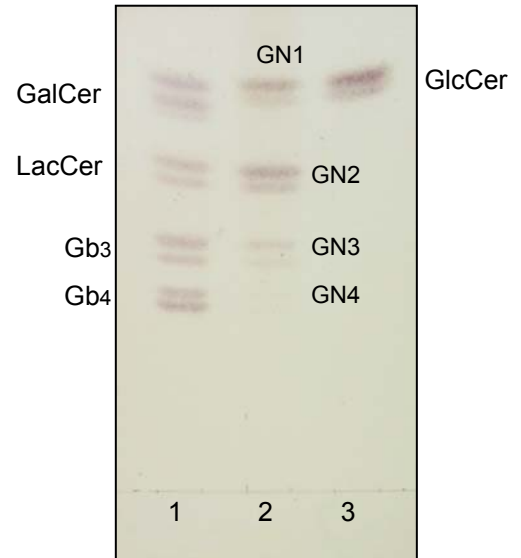


Figura 45. Densitograma obtenido a partir de una HPTLC de glicosfingolípidos neutros.

Se han encontrado cuatro glicosfingolípidos neutros diferentes, denominados de GN1 a GN4 en orden decreciente de su movilidad cromatográfica. Todos los glicosfingolípidos migraron en doble banda debido posiblemente a una diferente composición en ácidos grasos. En la tabla 17 y en la figura 46 se recoge la distribución porcentual de cada uno de ellos.

Tabla 17. Distribución porcentual de los glicosfingolípidos neutros.

| | % |
|------------|----------|
| GN1 | 31.2±4.8 |
| GN2 | 45.7±4.4 |
| GN3 | 19.6±3.4 |
| GN4 | 3.5±0.7 |

Los datos representan la media de cuatro determinaciones.

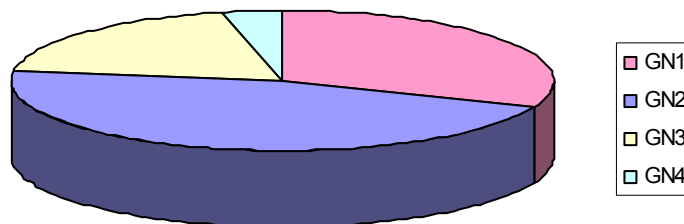


Figura 46. Distribución porcentual de los distintos glicosfingolípidos neutros de la leche de oveja.

El glicosfingolípidos mayoritario es GN2, con un 45.7% del total, seguido por GN1 con un 31.2%. GN2 ha sido identificado como lactosilceramida. Con respecto a GN1 su identificación resulta más difícil, ya que su movilidad cromatográfica es similar a la de glucosilceramida y a la de galactosilceramida. GN3 se identificó como Gb3 con un 19.6% y GN4 como Gb4 con un 3.5%. En la bibliografía no existen datos sobre glicosfingolípidos neutros en leche de oveja. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos en la leche de vaca, podemos observar que en ambas leches el glicosfingolípidos neutro mayoritario es la LacCer. En vaca éste aparece con un porcentaje del 65.3% (*Newburg and Chaturvedi, 1992*), algo superior al obtenido en nuestro estudio para la leche de oveja, que es del 45.7%. En la leche humana la LacCer ocupa el segundo lugar con un 21.1%. Además de LacCer la leche de vaca

contiene otro glicosfingolípido neutro, la GlcCer con un porcentaje del 34.7%. Podríamos suponer entonces que por similitud con la leche de vaca, el GN1 de nuestras muestras se correspondiera con GlcCer. En la leche humana apenas hay GlcCer, siendo el glicosfingolípido neutro más abundante la GalCer, con un 74.2%. Hemos observado que en la leche de oveja existen otros dos glicosfingolípidos neutros que no están presentes en la leche de vaca pero sí en la humana, y que han sido identificados como Gb3 y Gb4. La leche humana tiene una cantidad bastante menor de Gb3 que la de oveja, un 2.7%, y una cantidad de Gb4 ligeramente inferior, un 2.1% (*Newburg and Chatuverdi, 1992*).

Estos resultados son interesantes, ya que Gb3 y Gb4 contienen en su estructura una galactosa α 1-4 galactosa que parece actuar como receptor para las adhesinas de cepas *E. coli* patógenas (*Newburg and Chatuverdi, 1992*). Además se ha descrito que el Gb3 es también el receptor de la toxina Shiga 1 (*Schweppe et al., 2008*).

3.5.3. INMUNODETECCIÓN EN PLACA

Después de identificar los glicosfingolípidos neutros en base a su movilidad cromatográfica utilizamos el anticuerpo anti-galactocerebrósido para comprobar la presencia de galactosilceramida en nuestras muestras, ya que como hemos comentado anteriormente, glucosilceramida y galactosilceramida tienen la misma movilidad cromatográfica. Con el uso de este anticuerpo pudimos comprobar que la leche de oveja contiene además de glucosilceramida, una pequeña cantidad de galactosilceramida, como se observa en la figura 47.

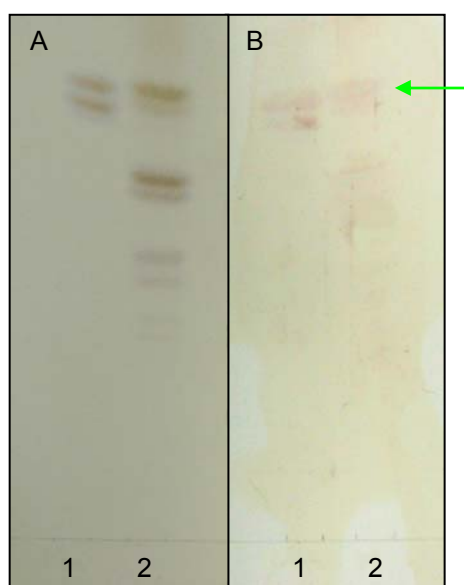


Figura 47. Inmunodetección de galactosilceramida.

- A. Revelado químico
- B. Revelado inmunológico
- 1. Patrón de GalCer
- 2. Glicolípidos neutros de leche de oveja

3.5.4. PRUEBAS ENZIMÁTICAS

Una vez que teníamos identificados los cinco glicoesfingolípidos neutros presentes en la leche de oveja, decidimos hacer una última comprobación utilizando unas pruebas enzimáticas descritas anteriormente (apartado 2.7.2.3.).

En la figura 48 podemos observar que, tras el tratamiento con una α -galactosidasa la galactosa terminal del Gb3 se hidroliza formándose lactosilceramida, por lo que desaparece la mancha correspondiente a Gb3.

Tratando la muestra con una *N*-acetilglucosaminidasa, la *N*-acetilgalactosamina terminal del Gb4 se hidroliza, formándose Gb3 y desapareciendo la mancha de Gb4 (figura 49).

Figura 48. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de glicoesfingolípidos neutros.

1. Muestra de glicoesfingolípidos neutros de leche de oveja
2. Muestra de glicoesfingolípidos neutros de leche de oveja tratada con α -galactosidasa

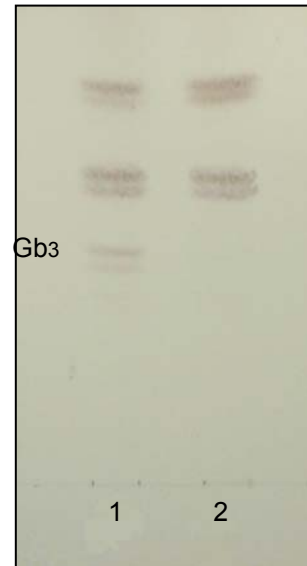


Figura 49. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de glicoesfingolípidos neutros.

1. Muestra de glicoesfingolípidos neutros de leche de oveja
2. Muestra de glicoesfingolípidos neutros de leche de oveja tratada con *N*-acetilglucosaminidasa

3.5.5. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS

El estudio de los glicoesfingolípidos neutros se completa con el análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos grasos que forman parte de su estructura. La determinación se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como ya se describió en el apartado 2.7.3. Los ácidos grasos se separan mediante metanolisis con metanol/HCl. Este proceso libera los distintos componentes de los glicoesfingolípidos neutros, como pueden ser monosacáridos, bases esfingoides y ácidos grasos.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) formados se extraen con hexano, se disuelven en isooctano y se inyectan en un cromatógrafo de gases, donde son volatilizados a altas temperaturas y separados en una columna capilar. La derivatización como ésteres metílicos es necesaria ya que los ácidos grasos no derivatizados son más difícilmente volatilizables. Finalmente se obtiene un cromatograma (figura 50) en el que cada pico corresponde a un determinado éster metílico, y por tanto, a un ácido graso.

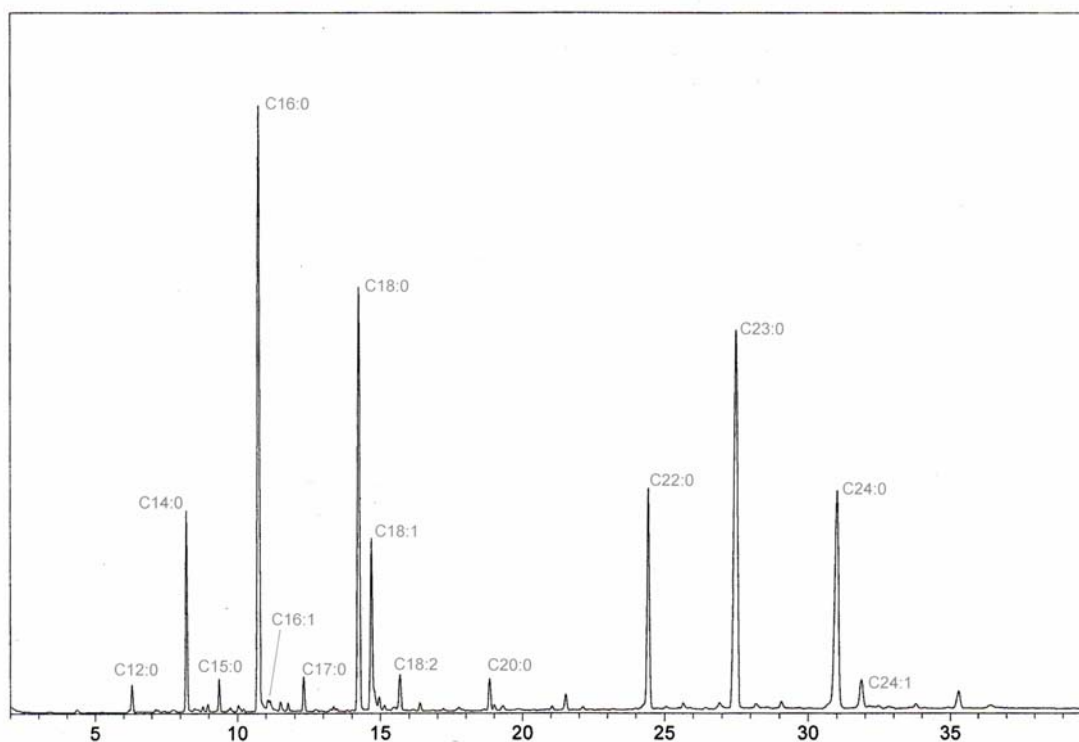


Figura 50. Cromatograma de los ácidos grasos de los glicoesfingolípidos neutros.

La identificación de cada uno de los picos se realiza por comparación de sus tiempos de retención con los de una batería de patrones comerciales y por su espectro de masas característico. En la figura 51 podemos observar la distribución porcentual de los distintos ácidos grasos que forman parte de los glicoesfingolípidos neutros de la leche de oveja.

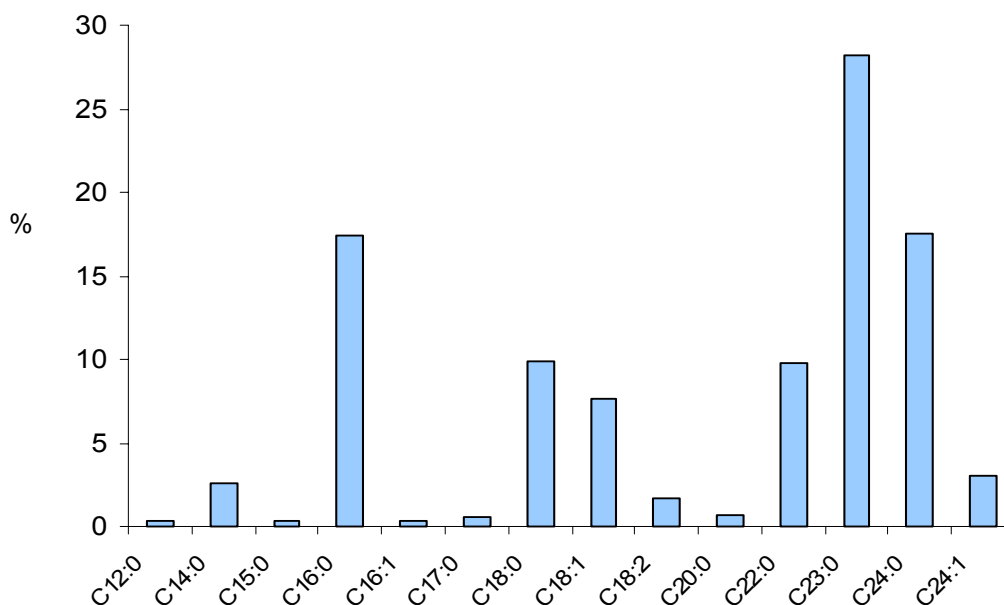


Figura 51. Distribución porcentual (%) de cada uno de los ácidos grasos en los glicoesfingolípidos neutros de la leche de oveja.

Podemos clasificar los ácidos grasos atendiendo a dos criterios diferentes, la longitud de la cadena hidrocarbonada, es decir, el número de átomos de carbono, y el grado de saturación de la cadena. Según el primer criterio, los ácidos grasos se clasifican en tres tipos:

- Ácidos grasos de cadena media (MCFA): C10-C15
- Ácidos grasos de cadena larga (LCFA): C16-C21
- Ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA): >C21

Considerando el segundo criterio, los ácidos grasos se clasifican en tres tipos:

- Ácidos grasos saturados (SFA)
- Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA)
- Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

En las abreviaturas se utiliza la terminología inglesa, la más utilizada en el estudio de los ácidos grasos.

En la tabla 18 podemos ver el porcentaje de los ácidos grasos encontrados.

Tabla 18. Porcentaje de los ácidos grasos de los glicoesfingolípidos neutros.

| | FA | % | Suma % |
|--------------|-------|----------|--------|
| MCFA | C10:0 | 0.2±0.0 | 3.5 |
| | C12:0 | 0.3±0.1 | |
| | C14:0 | 2.6±0.3 | |
| | C15:0 | 0.4±0.1 | |
| LCFA | C16:0 | 17.4±1.1 | 38.1 |
| | C16:1 | 0.3±0.1 | |
| | C17:0 | 0.5±0.2 | |
| | C18:0 | 9.9±2.2 | |
| | C18:1 | 7.6±2.2 | |
| | C18:2 | 1.7±1.0 | |
| | C20:0 | 0.7±0.2 | |
| VLCFA | C22:0 | 9.8±1.5 | 58.6 |
| | C23:0 | 28.2±2.5 | |
| | C24:0 | 17.6±0.6 | |
| | C24:1 | 3.0±0.9 | |
| SFA | | | 87.6 |
| MUFA | | | 10.9 |
| PUFA | | | 1.7 |

Los datos representan la media de cuatro determinaciones.

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; MCFA: ácidos grasos de cadena media (C10-C15); LCFA: ácidos grasos de cadena larga (C16-C21); VLCFA: ácidos grasos de cadena muy larga (>C21)

Como podemos observar tanto en la figura 50, como en la tabla 18, el C23:0 es el ácido graso más abundante en los glicoesfingolípidos de la leche de oveja, con un porcentaje del 28.2%, seguido por el C24:0 que representa el 17.6%. El tercero más abundante es el C16:0 con un porcentaje del 17.4%. El resto de ácidos grasos representa un porcentaje mucho menor.

Aunque no existen datos en la bibliografía sobre el contenido en ácidos grasos de los glicoesfingolípidos neutros de la leche de oveja, sí encontramos datos acerca del contenido de ácidos grasos de la grasa de la leche de oveja en general (*Ramos y Juárez, 1986*). Así vemos que el ácido graso mayoritario en la leche de oveja es el

C16:0, con valores muy próximos a C18:1. Es normal que difiera de nuestros resultados, ya que nosotros estamos estudiando un grupo concreto de compuestos.

Sí podemos comparar nuestros resultados con los obtenidos para los glicoesfingolípidos neutros de la leche de vaca por *Sánchez-Juanes (2007)*. El patrón de ácidos grasos es bastante diferente. Mientras que en leche de oveja el ácido graso mayoritario es el C23:0 con un 28.2%, en la leche de vaca el mayoritario es el C16:0 con un 26.1%. El segundo más abundante es el C24:0 en oveja con un 17.5% y el C18:0 en vaca con un 19.7%.

En cuanto a la longitud de la cadena de los ácidos grasos, encontramos que en leche de oveja, el 3.5% son MCFA, el 38.1% LCFA y el 58.6% VLCFA. Es un perfil muy diferente al de la leche de vaca, con un 9.4% para los MCFA, un 73.3% de LCFA y un 18.1% de VLCFA.

Si nos fijamos en el grado de saturación de la cadena, el 87.35% son SFA, el 10.95% son MCFA y el 1.65% son PUFA. En este caso el perfil es algo más parecido, ya que en la vaca los SFA también son mayoritarios, con un 74.7%, seguidos por los MCFA con un 22.00% y por último los PUFA con un 4.1%.

3.6. FOSFOLÍPIDOS

3.6.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS TOTALES

El valor obtenido para los fosfolípidos totales en la leche de oveja fue de 297.5 ± 12.8 mg/kg de leche.

En la bibliografía sólo encontramos un trabajo en el que hacen referencia a la cantidad total de fosfolípidos en la leche de oveja, *Morrison and Smith (1967)*, que aportaron valores de 430 y 580 mg/kg de leche. Nuestro dato es bastante inferior al de estos autores y podría deberse a diferencias en la raza, estado de lactación, metodología empleada, etc, como ya se ha señalado anteriormente.

3.6.2. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS

En primer lugar los fosfolípidos totales de la leche se purificaron utilizando una cromatografía unidimensional en TLC y un líquido de desarrollo que deja los fosfolípidos en el depósito mientras que el resto de lípidos son arrastrados por el frente (figura 52), como ya se explicó anteriormente (apartado 2.8.2.).

Figura 52. TLC unidimensional para la purificación de fosfolípidos revelada con yodo. El carril 1 contiene una muestra de fosfatidilserina, y el 2 una muestra fosfolípidos.

PLs: fosfolípidos

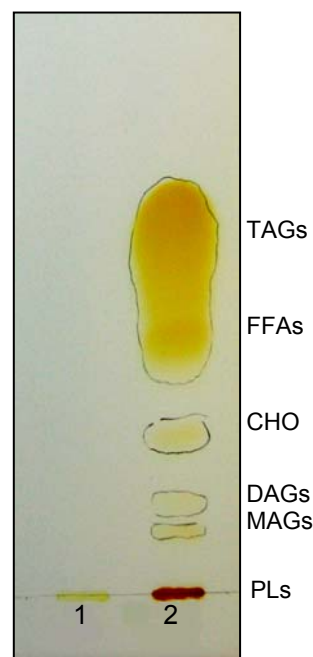
MAGs: monoacilgliceroles

DAGs: diacilgliceroles

CHO: colesterol

FFAs: ácidos grasos libres

TAGs: triacilgliceroles

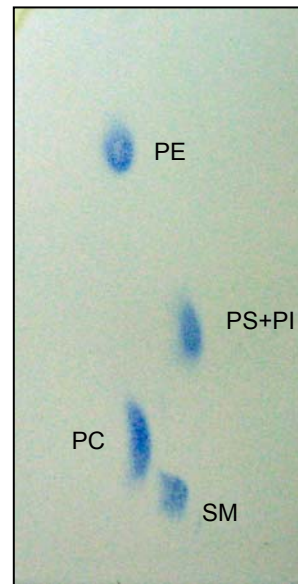


Raspando el depósito y lavándolo con una mezcla de cloroformo/metanol obtuvimos una muestra de fosfolípidos puros.

Estos fosfolípidos se sometieron en primer lugar a una cromatografía bidimensional en TLC como se explicó en el apartado 2.8.2. De esta forma se consiguió la separación de cuatro manchas diferentes (figura 53), correspondientes a distintos fosfolípidos que se identificaron por comparación de su movilidad cromatográfica con la de patrones comerciales: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI). En este tipo de cromatografía la PS y el PI tienen una movilidad cromatográfica similar, por lo que aparecen formando parte de una única mancha.

Figura 53. TLC bidimensional de una muestra de fosfolípidos de leche de oveja revelada con Phospray.

PE: fosfatidiletanolamina
 PS: fosfatidilserina
 PI: fosfatidilinositol
 PC: fosfatidilcolina
 SM: esfingomielina



Aunque este es el método más utilizado para la separación de fosfolípidos para su posterior cuantificación y en la mayoría de los trabajos se dan valores conjuntos para PS+PI, decidimos probar otra cromatografía diferente (unidimensional) para intentar la separación de PS y PI y poderlos estudiar de forma individual (figura 54).



Figura 54. TLC unidimensional de una muestra de fosfolípidos purificados revelada con Phospray.

PE: fosfatidiletanolamina
 PI: fosfatidilinositol
 PS: fosfatidilserina
 PC: fosfatidilcolina
 SM: esfingomielina

3.6.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS INDIVIDUALES

Para valorar cada uno de los fosfolípidos individuales presentes en la leche, se rasparon por separado las manchas obtenidas en las cromatografías anteriores y se utilizó el método de valoración del fósforo, de la misma manera que se hizo con los fosfolípidos totales.

En la tabla 19 y en la figura 55 se muestran los porcentajes relativos de cada fosfolípido individual con respecto al total.

Tabla 19. Porcentajes relativos de los fosfolípidos individuales.

| | % |
|----------------------------|----------|
| FOSFATIDILCOLINA | 27.0±0.9 |
| FOSFATIDILSERINA | 10.3±0.8 |
| FOSFATIDILINOSITOL | 6.6±0.5 |
| FOSFATILETANOLAMINA | 25.2±2.8 |
| ESFINGOMIELINA | 30.4±1.3 |

Los datos representan la media de seis determinaciones de cada muestra.

En la bibliografía solo encontramos un trabajo, el de *Morrison* (1968), que haga referencia al contenido de fosfolípidos individuales en la leche de oveja. Los datos aportados por este autor para la PC y la SM son bastante semejantes a los nuestros, siendo 29.2 y 28.3% respectivamente. Sin embargo, sus valores difieren un poco más con respecto a los otros tres fosfolípidos valorados. Nuestro valor de PE (25.21%) es algo inferior al obtenido en el trabajo de Morrison, que es de 36.0%. En cambio, nosotros obtenemos valores superiores de PS y PI, siendo estos del 10.3 y 6.6% respectivamente. Los datos encontrados en la bibliografía son de 3.1 y 3.4 respectivamente.

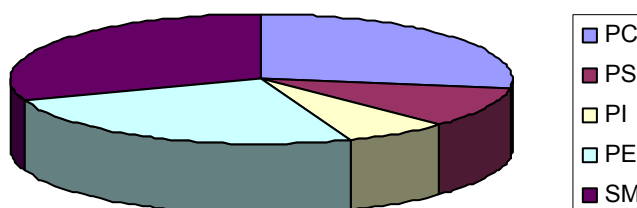


Figura 55. Distribución porcentual de los distintos fosfolípidos de la leche de oveja.

3.6.4. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLÍPIDOS TOTALES

La determinación de los ácidos grasos de los fosfolípidos se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como ya se describió en el apartado 2.8.3. Los ácidos grasos se separan mediante metanolisis con BF₃-metanol. En este proceso se liberan los ácidos grasos como ésteres metílicos.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) se extrajeron con éter de petróleo, se disolvieron en isooctano y se inyectaron en un cromatógrafo de gases. Finalmente se obtiene un cromatograma (figura 56) en el que cada pico corresponde a un determinado éster metílico, y por tanto, a un ácido graso.

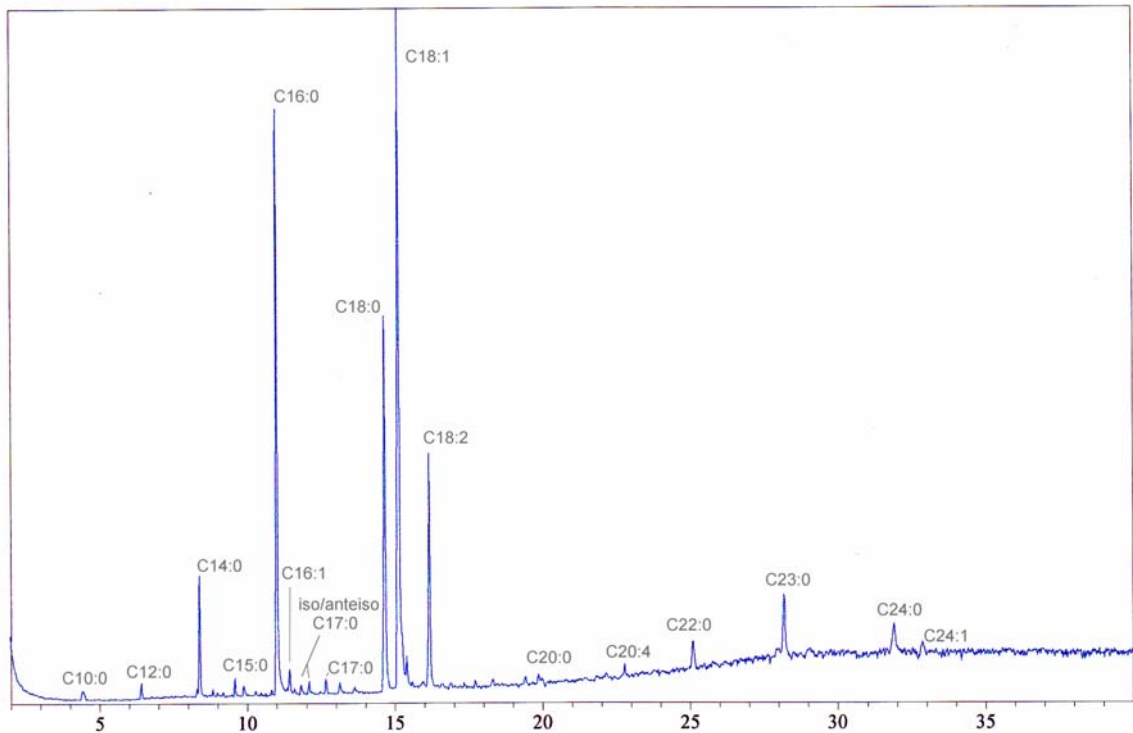


Figura 56. Cromatograma de los ácidos grasos de los fosfolípidos totales.

En la figura 57 podemos observar la distribución porcentual de los distintos ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de la leche de oveja.

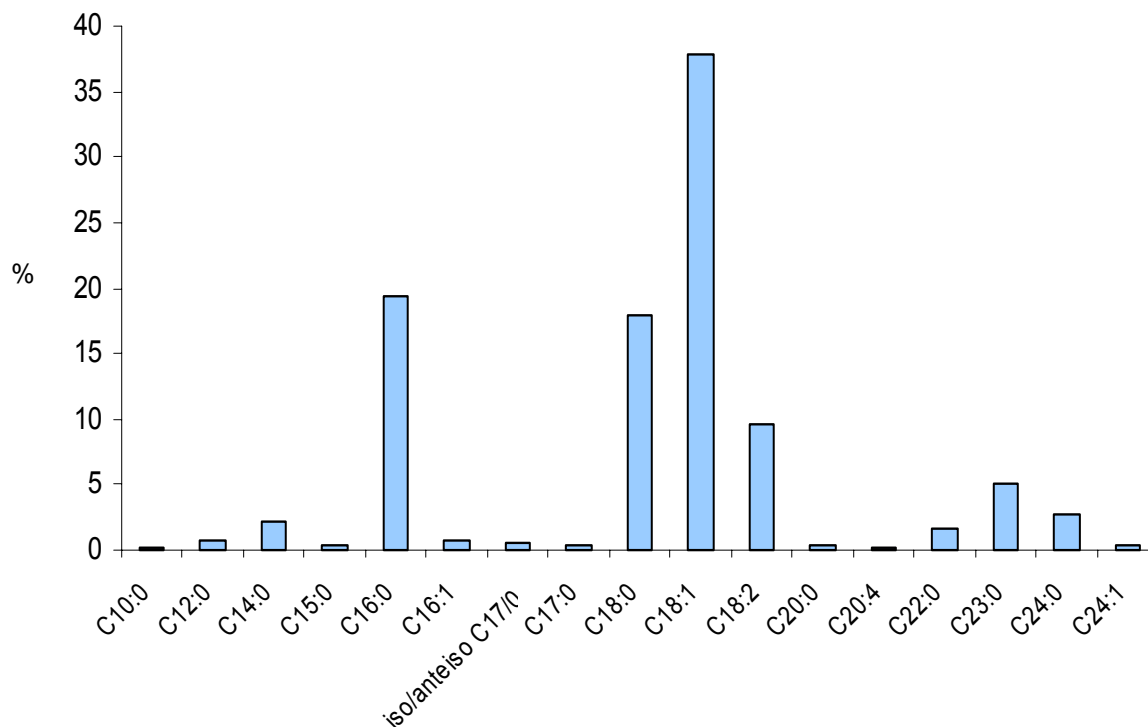


Figura 57. Distribución porcentual (%) de cada uno de los ácidos grasos en los fosfolípidos de la leche de oveja.

En la tabla 20 podemos ver los porcentajes para los distintos ácidos grasos identificados.

Aunque no encontramos datos en la bibliografía sobre la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos totales de la leche de oveja, podemos comparar nuestros datos con los obtenidos por *Sánchez-Juanes (2007)* para los fosfolípidos de la leche de vaca. La principal diferencia es que mientras que en los fosfolípidos de la leche de oveja el ácido graso mayoritario es el C18:1 con un 38%, en los fosfolípidos de la leche de vaca éste ocupa la segunda posición con un 24.7%. En ésta el más abundante es C16:0, con un 31.5%. En la leche de oveja el segundo más abundante es el C16:0 con un 19.5%. La cantidad de C18:0 es muy similar en ambas leches, siendo de 18.0% en la oveja, y de 19.3% en vaca.

Si nos fijamos en la longitud de la cadena de los ácidos grasos, tanto en leche de oveja, como de vaca, los más abundantes son los LCFA con un 87.1 y 84.4% respectivamente. Sin embargo, la oveja tiene más VLCFA (9.5%) que MCFA (3.4%) y en la vaca ocurre lo contrario (0.6% de VLCFA y 15.0% de MCFA).

Tabla 20. Porcentaje de los ácidos grasos identificados en los fosfolípidos totales de la leche de oveja.

| | FA | % | Suma % |
|-------|-------------------|----------|--------|
| MCFA | C10:0 | 0.2±0.0 | 3.4 |
| | C12:0 | 0.7±0.4 | |
| | C14:0 | 2.2±0.1 | |
| | C15:0 | 0.3±0.1 | |
| LCFA | C16:0 | 19.5±1.6 | 87.1 |
| | C16:1 | 0.7±0.4 | |
| | iso/anteiso C17:0 | 0.5±0.2 | |
| | C17:0 | 0.5±0.0 | |
| | C18:0 | 18.0±1.0 | |
| | C18:1 | 38.0±0.6 | |
| | C18:2 | 9.6±0.3 | |
| | C20:0 | 0.3±0.0 | |
| VLCFA | C22:0 | 1.6±0.6 | 9.5 |
| | C23:0 | 5.1±0.6 | |
| | C24:0 | 2.8±0.9 | |
| SFA | | | 51.7 |
| MUFA | | | 38.7 |
| PUFA | | | 9.6 |

Los datos representan la media de tres determinaciones.

3.6.5. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLÍPIDOS INDIVIDUALES

De la misma forma que hicimos con los fosfolípidos totales, llevamos a cabo el estudio de los ácidos grasos de los fosfolípidos individuales. En las figuras 58 y 59 podemos observar los cromatogramas correspondientes a cada uno de los fosfolípidos.

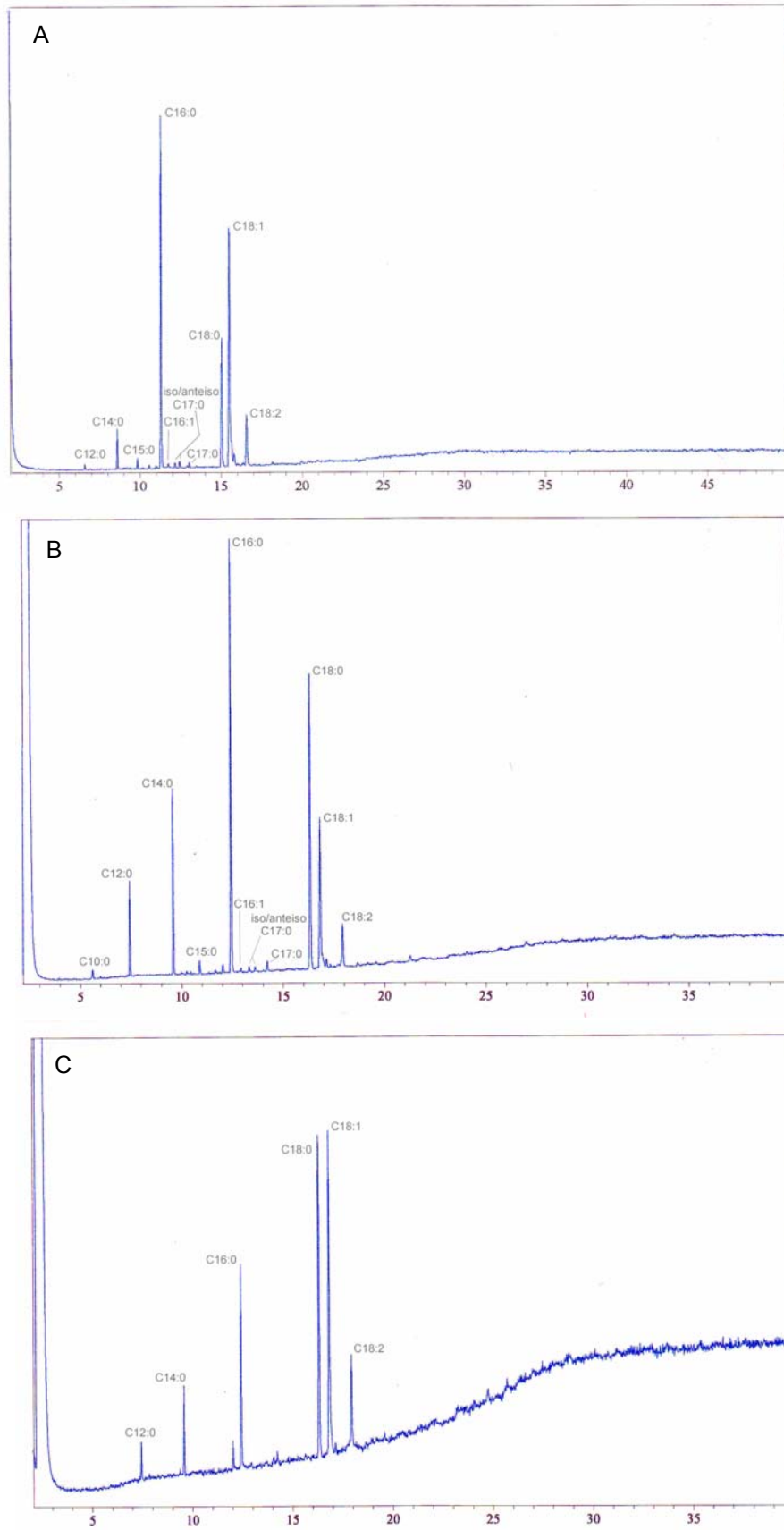


Figura 58. Cromatogramas de los ácidos grasos de fosfatidilcolina (A), fosfatidilserina (B) y fosfatidilinositol (C).

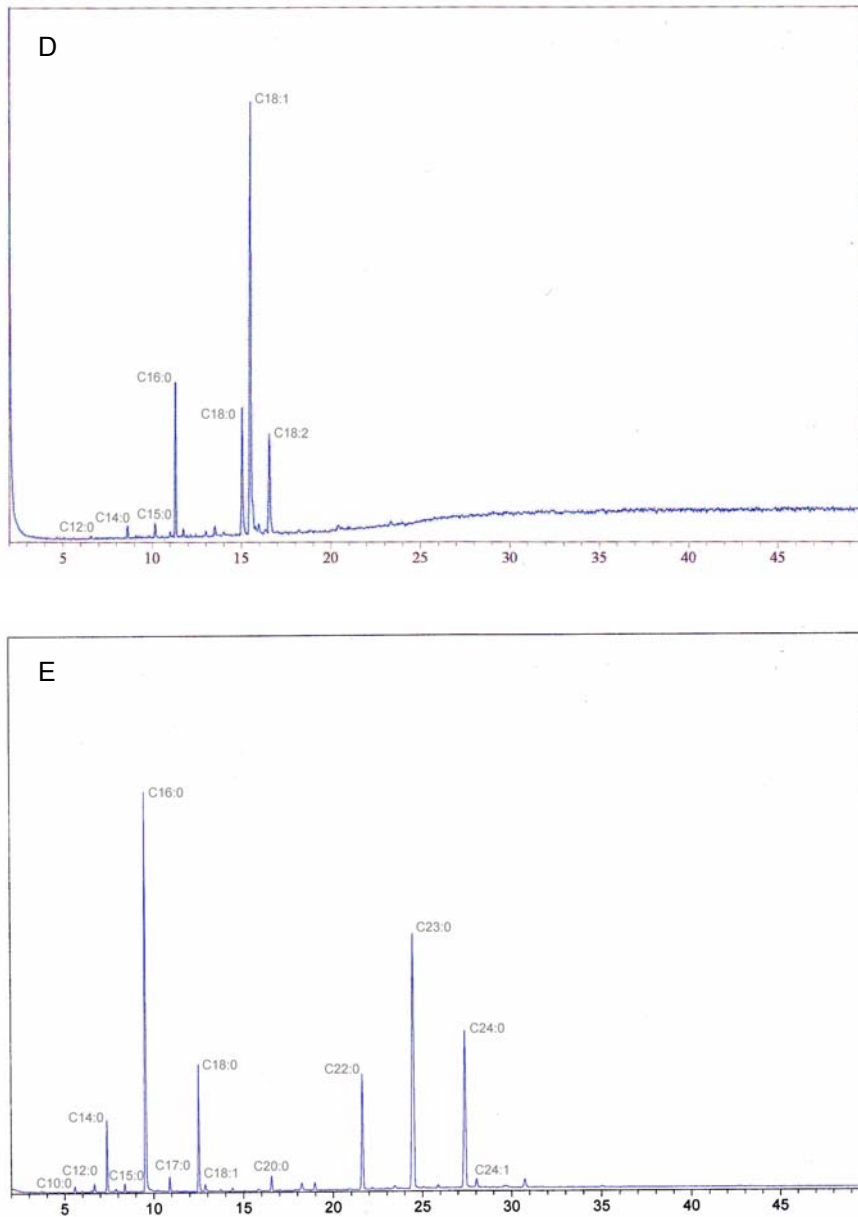


Figura 59. Cromatogramas de los ácidos grasos de fosfatidiletanolamina (D) y esfingomielina (E).

En la tabla 21 se muestran las proporciones relativas de cada ácido graso para cada uno de los fosfolípidos estudiados y figura 60 muestra un diagrama con todos los valores de forma conjunta.

Tabla 21. Porcentaje de los ácidos grasos de los fosfolípidos individuales de la leche de oveja.

| FA | PC | PS | PI | PE | SM |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| C10:0 | 0.7±0.0 | 1.1±0.6 | 1.4±0.0 | - | 0.1±0.0 |
| C12:0 | 0.8±0.5 | 4.3±0.9 | 3.1±0.3 | 0.2±0.0 | 0.4±0.3 |
| C14:0 | 2.8±0.5 | 9.2±0.6 | 9.1±1.0 | 1.4±0.7 | 1.6±1.0 |
| C15:0 | 1.0±0.5 | 0.9±0.2 | 2.0±0.0 | 1.3±0.4 | 0.3±0.1 |
| C16:0 | 34.8±3.0 | 28.8±1.7 | 25.5±3.5 | 12.0±1.4 | 25.0±2.5 |
| C16:1 | 0.6±0.3 | - | - | 0.5±0.1 | - |
| iso/anteiso C17:0 | 0.9±0.5 | - | - | - | - |
| C17:0 | 0.6±0.2 | 0.9±0.3 | 2.2±0.0 | 0.5±0.5 | 0.5±0.1 |
| C18:0 | 18.9±2.2 | 33.9±1.9 | 28.6±4.2 | 17.5±0.9 | 6.3±1.2 |
| C18:1 | 32.3±5.8 | 16.7±1.9 | 25.2±3.3 | 53.6±2.7 | 0.6±0.2 |
| C18:2 | 5.7±1.3 | 4.3±0.9 | 5.6±0.6 | 13.4±1.0 | |
| C20:0 | 0.6±0.0 | - | - | - | 0.7±0.2 |
| C22:0 | - | - | - | - | 10.6±1.0 |
| C23:0 | - | - | - | - | 32.1±4.3 |
| C24:0 | - | - | - | - | 21.0±1.0 |
| C24:1 | - | - | - | - | 1.8±0.9 |

Los datos representan la media de tres determinaciones.

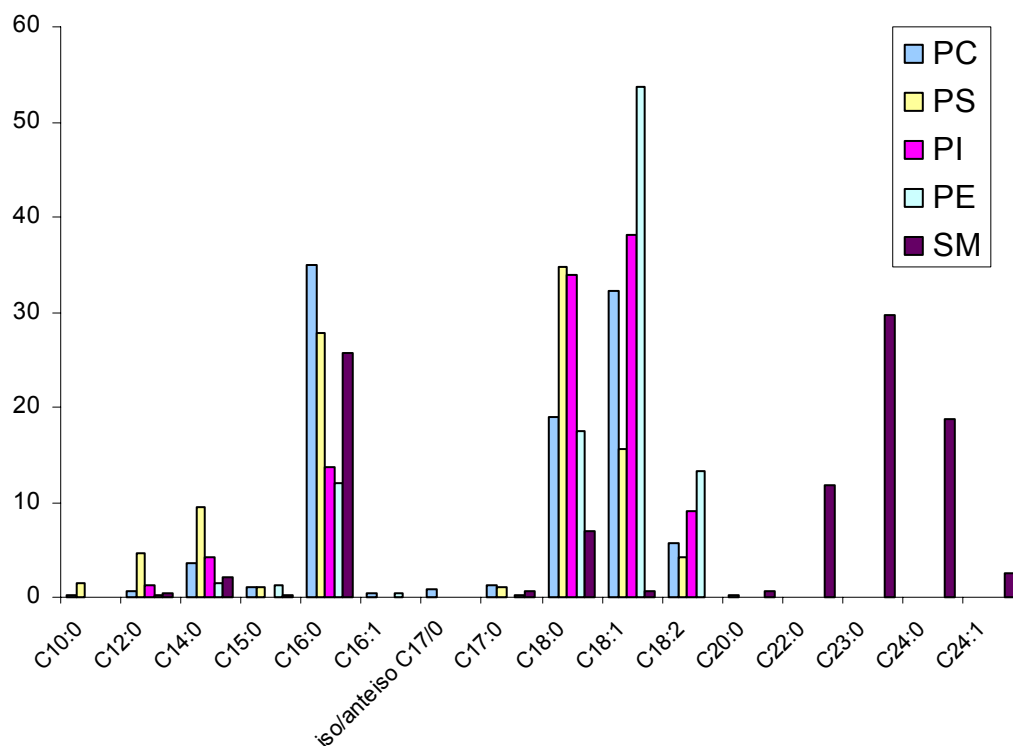


Figura 60. Proporción relativa de cada ácido graso en cada uno de los fosfolípidos.

Morrison y Smith (1967) identificaron y cuantificaron los ácidos grasos de los fosfolípidos individuales de la leche de oveja. Los resultados obtenidos por estos autores son muy similares a los nuestros en el caso de PC y SM, y también muy parecidos, aunque con pequeñas variaciones en el caso de la PE. Para la PC el ácido graso mayoritario es C16:0 con un 34.8% (38.2% según estos autores), seguido por C18:1 y C18:0. En el caso de la SM el ácido graso más abundante es C23:0 con un 32.1% (27.2% según *Morrison y Smith*, 1967), seguido por el C16:0 y el C24:0. Con respecto a la PE, el ácido graso mayoritario es C18:1 con un 53.6% (52.2% según estos autores). *Morrison y Smith* (1967) concluyeron que los siguientes en abundancia eran C16:0, C18:0 y C18:2, mientras que nosotros encontramos que eran C18:0 y C18:2 y C16:0. Aunque el orden es algo diferente, los porcentajes son muy parecidos.

3.7. OLIGOSACÁRIDOS

Además del estudio de los glicoesfingolípidos y de los fosfolípidos, se procedió también a la determinación del contenido de oligosacáridos sialilados presentes en la leche de oveja.

La separación de los oligosacáridos se realizó mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) como se ha descrito en el apartado 2.9.2. La figura 61 muestra dos placas iguales desarrolladas en distintos solventes.

En el carril 3 de la figura 61-B, correspondiente a la muestra de oligosacáridos de leche de oveja, podemos observar cuatro bandas mayoritarias. En la figura 61-A, los oligosacáridos se separan peor, y no se observan las cuatro bandas con nitidez. Aunque no podemos hacer una identificación exhaustiva por comparación de su movilidad relativa con respecto a la de los patrones, sí podemos sacar algunas conclusiones.

En la bibliografía no hay ningún estudio sobre oligosacáridos en leche madura de oveja, aunque sí hay algunos datos sobre oligosacáridos del calostro. *Urashima et al.* (2001) describían la presencia en el calostro de oveja de tres formas distintas de sialilactosa: 3'-N-acetilneuraminilactosa, 3'-N-glicolilneuraminilactosa y 6'-N-glicolilneuraminilactosa.

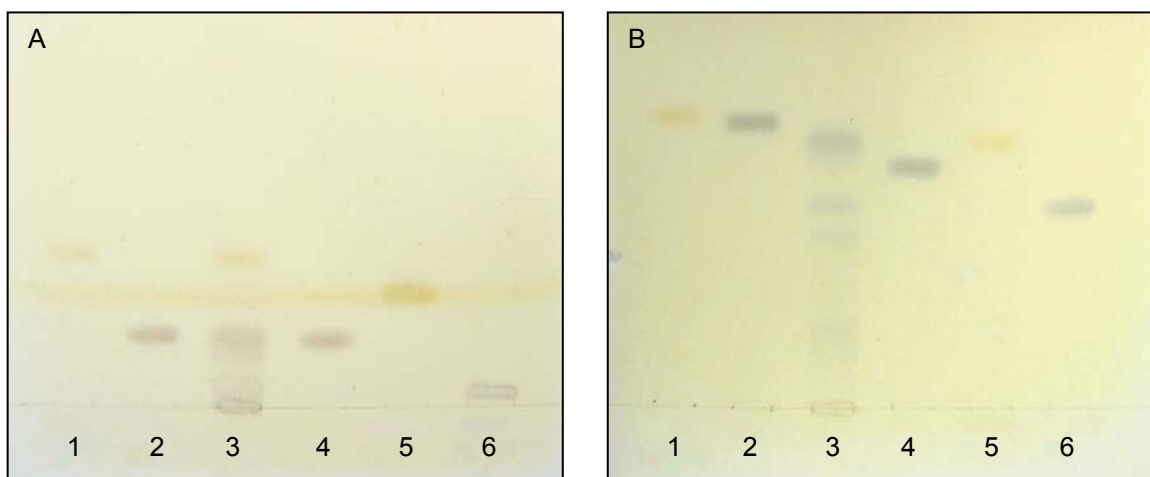


Figura 61. Cromatografías en capa fina de alta resolución (HPTLC) de oligosacáridos de leche de oveja reveladas con resorcinol. En la figura A se utilizó como líquido de desarrollo butanol/H₂O/ácido acético (110:45:45) (v/v) y en la B, el líquido utilizado fue butanol/etanol/H₂O/ácido acético/piridina (5:50:15:1.5:5) (v/v).

1. Lactosa
2. 3'-sialillactosa
3. Oligosacáridos de leche de oveja
4. 6'-sialillactosa
5. Galactosillactosa
6. Disialil-lacto-N-tetraosa

En la figura 61-A podemos observar una banda coincidente con los patrones 2 y 4, confirmando así la presencia de sialillactosa en la leche madura de oveja. En este líquido de desarrollo 3' y 6'-sialillactosa tienen prácticamente la misma movilidad cromatográfica, por lo que no es posible discriminar entre ambas. Con el segundo líquido de desarrollo (figura 61-B) 3'-sialillactosa queda por encima de 6'-sialillactosa. Nuestra banda presenta una posición intermedia entre ambas, y no coincide exactamente con ninguna de ellas. La diferencia en la movilidad cromatográfica se debe a que los patrones utilizados son *N*-acetilneuraminillactosa, y en la oveja probablemente sean mayoritarias las formas de sialillactosa con NeuGc, por lo que nuestra banda puede ser una sialillactosa con NeuGc. A pesar de que en el calostro están descritas tres formas de galactosillactosa, nosotros no hemos podido detectar su presencia, si hubiera, la cantidad sería mínima. En la figura 61-B una de las bandas de la muestra parece coincidente con el patrón de disialillacto-*N*-tetraosa. No es probable la presencia de este oligosacárido complejo en la leche de oveja. De hecho, si observamos la figura 61-A, no parece que este patrón coincida con ningún oligosacárido de la muestra.

Las bandas no identificadas serán probablemente oligosacáridos más complejos que la sialilactosa, que no podemos determinar sin los patrones correspondientes.

Mediante HPAEC-PAD, tratamos de identificar la misma muestra de oligosacáridos, obteniendo el cromatograma que se muestra en la figura 62. El perfil cromatográfico es muy similar al obtenido mediante esta misma técnica por *Martínez-Ferez* (2006) también para leche de oveja.

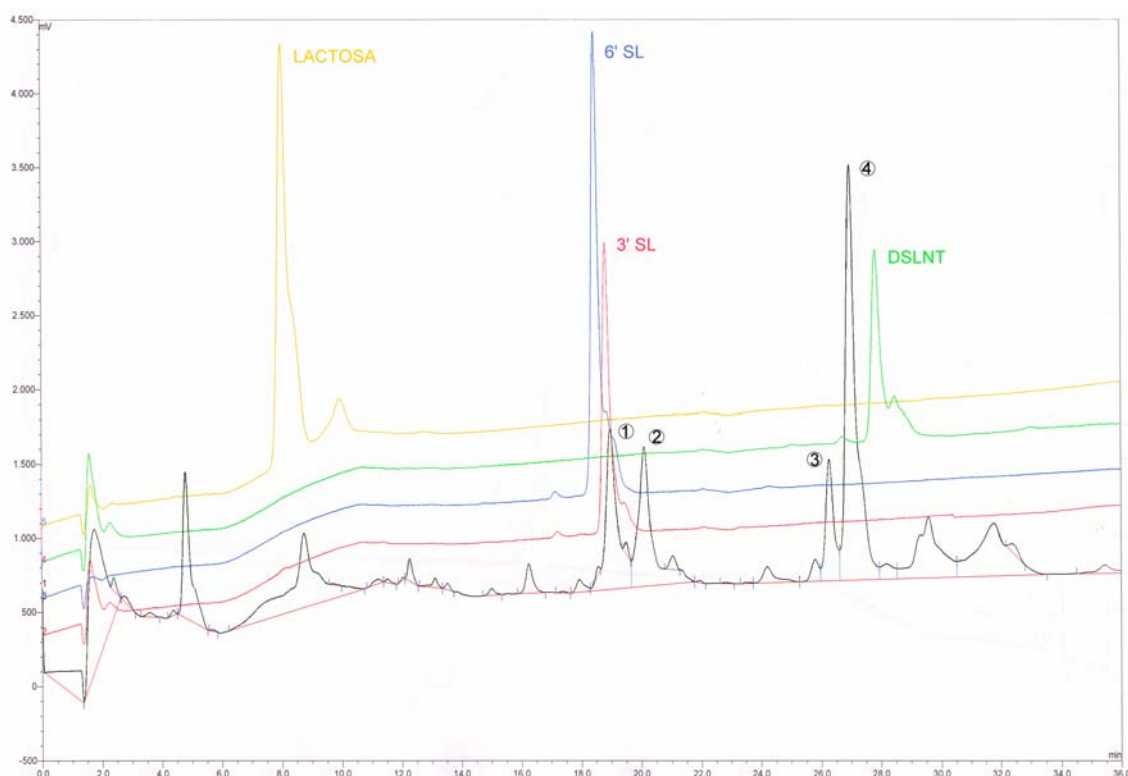


Figura 62. Cromatograma obtenido mediante HPAEC-PAD de una muestra de oligosacáridos de leche de oveja. El perfil negro corresponde a una muestra de oligosacáridos de leche de oveja. 3' SL: 3'-sialilactosa; 6' SL: 6'-sialilactosa; DSLNT: disialilacto-*N*-tetraosa.

Como se puede observar en la figura 62 hay numerosos picos en la muestra difíciles de identificar por la falta de patrones. El pico 1 coincide con el patrón de 3' SL conteniendo NeuAc. En experimentos en los que se inyectaron de forma conjunta la muestra y el patrón de 3' SL NeuAc, esta última coincidía exactamente con el pico 1. Por el contrario, no se encontró coincidencia para el patrón de 6' SL conteniendo NeuAc que debería estar justamente por delante del pico de 3' SL. Hay dos picos más, 3 y 4, que podrían corresponder a 6' SL y 3' SL conteniendo NeuGc respectivamente. *Martínez-Ferez et al.* (2006) detectaron mediante HPAEC-PAD dos picos que

identifican como NeuGc lactosa y cuyos tiempos de retención prácticamente coinciden con los de estos dos picos.

Por último el cromatograma obtenido por espectrometría de masas nos permitió corroborar la existencia de NeuAcLac y NeuGcLac (figura 63).

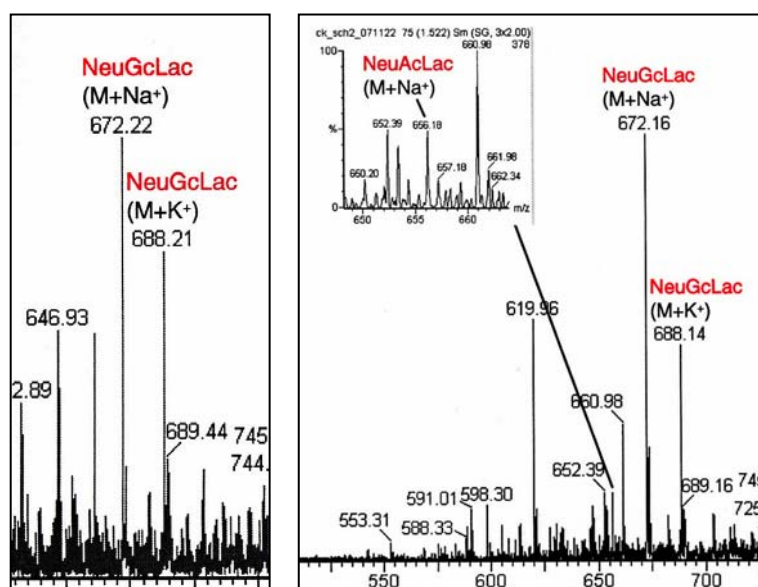


Figura 63. Detalles del cromatograma obtenido por espectrometría de masas para los oligosacáridos de la leche de oveja.

En resumen, hemos identificado la presencia de 3' SL conteniendo NeuAc y tentativamente la presencia de 3' SL y 6' SL conteniendo NeuGc, siendo éste último el oligosacárido sialilado más abundante de la leche de oveja.

3.8. ADHESIONES BACTERIANAS

3.8.1. ENSAYOS DE HEMAGLUTINACIÓN

Los estudios de hemaglutinación se llevaron a cabo con seis cepas diferentes de *Escherichia coli*, cuatro enterotoxigénicas para terneros: K99, F41, FK y Att25, y dos uropatogénicas humanas: FVL25 y FVL3.

Para llevar a cabo estos experimentos de hemaglutinación utilizamos eritrocitos de caballo, ya que desde hace mucho tiempo se conoce la capacidad hemaglutinante

de las fimbrias K99 con respecto a estos eritrocitos (Lingahl and Wadström, 1984). También decidimos probar eritrocitos de ovino, realizando todos los experimentos con ambos tipos de eritrocitos de forma paralela.

Como ya se explicó anteriormente (apartado 2.10.) algunas aglutinaciones se producen sólo en ausencia de manosa (sensibles a manosa) y otras se producen tanto en presencia como en ausencia de manosa (resistentes a manosa). Nuestras cepas presentan, en algunos casos, pilus tipo 1 cuya capacidad hemaglutinante es sensible a manosa; por ello decidimos hacer todos los estudios de adhesión en presencia de manosa al 3%, eliminando de esta manera la hemaglutinación debida a los pilus tipo 1.

En primer lugar realizamos una serie de pruebas para elegir las diluciones adecuadas de las distintas cepas bacterianas. A partir de la solución de partida se realizaron diluciones seriadas para encontrar la dilución en la que se producía una hemaglutinación susceptible de ser inhibida, lo que se denominó concentración mínima hemaglutinante (CMH) y fue diferente según las cepas (figura 64).

Como podemos observar en la figura 64 todas las cepas enterotoxigénicas de ternero producen hemaglutinación de los dos tipos de eritrocitos. Sin embargo, FVL25 no hemaglutina ningún tipo de eritrocitos y FVL3 sólo hemaglutina los eritrocitos de ovino.

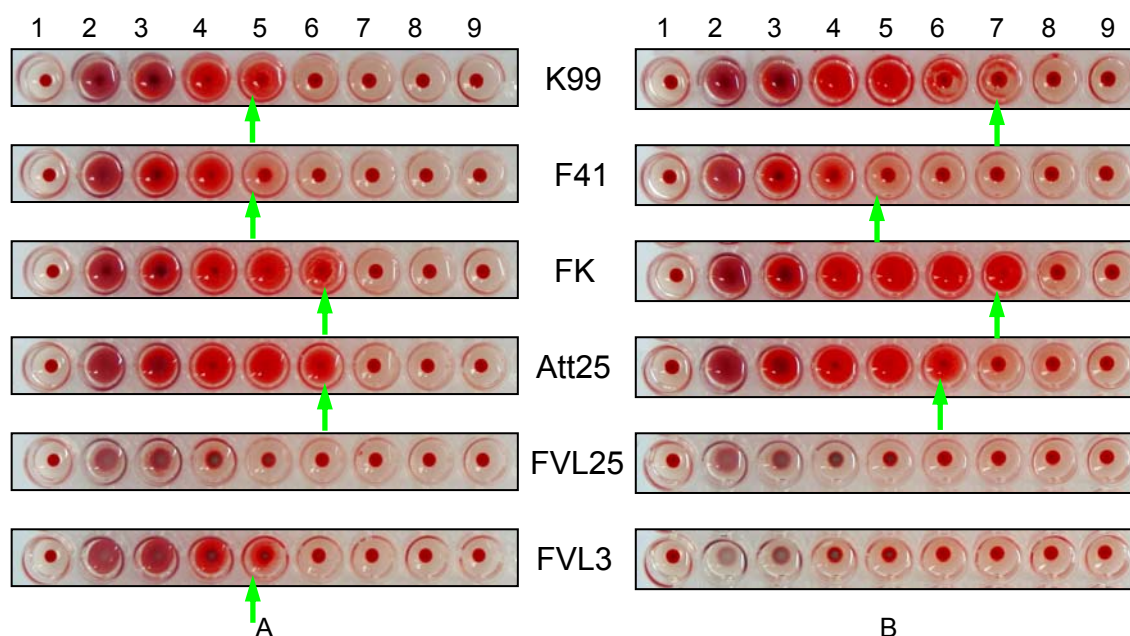


Figura 64. Hemaglutinación provocada por las distintas cepas. La figura A muestra el experimento realizado con eritrocitos de ovino, y la B con eritrocitos de caballo. El pocillo 1 es un control, que no contiene bacterias. Los pocillos de 2 a 9 contienen diluciones seriadas de bacterias preparadas a partir de la solución de partida, siendo el pocillo 2 el más concentrado (dilución $\frac{1}{2}$) y el 9 el más diluido (dilución $\frac{1}{256}$). La flecha verde señala la CMH de cada cepa.

Una vez comprobada la capacidad hemaglutinante de cada cepa realizamos una serie de experimentos para analizar el efecto de ciertos compuestos, algunos de ellos presentes en la leche, sobre la hemaglutinación provocada por las bacterias. Se decidió utilizar siempre tres tipos de diluciones diferentes por cepa en cada ensayo. Los compuestos utilizados fueron los siguientes: oligosacáridos de leche de oveja, 3'-sialillactosa y galactosil(α 1-3)lactosa.

Una vez llevados a cabo los experimentos como se describió anteriormente (apartado 2.10.1.), los resultados obtenidos se exponen en los apartados siguientes. En todos los estudios los resultados fueron similares para los eritrocitos de ovino y los de caballo.

3.8.1.1. Efecto de los oligosacáridos de leche de oveja.

Se decidió utilizar una muestra de oligosacáridos totales de leche de oveja para analizar si tenían algún efecto sobre la hemaglutinación provocada por las bacterias. Los oligosacáridos se obtuvieron en el laboratorio como se describió en el apartado 2.9.1. Se utilizaron 25 μ g/pocillo. Como podemos observar en la figura 65 obtuvimos resultados similares para todas las cepas estudiadas. En los pocillos que contenían oligosacáridos se observó una inhibición de la hemaglutinación provocada por cada una de las cepas.

La inhibición de la hemaglutinación por parte de los oligosacáridos podría deberse a que éstos se unan a la superficie de las bacterias impidiendo así la posterior adhesión de éstas a los eritrocitos.

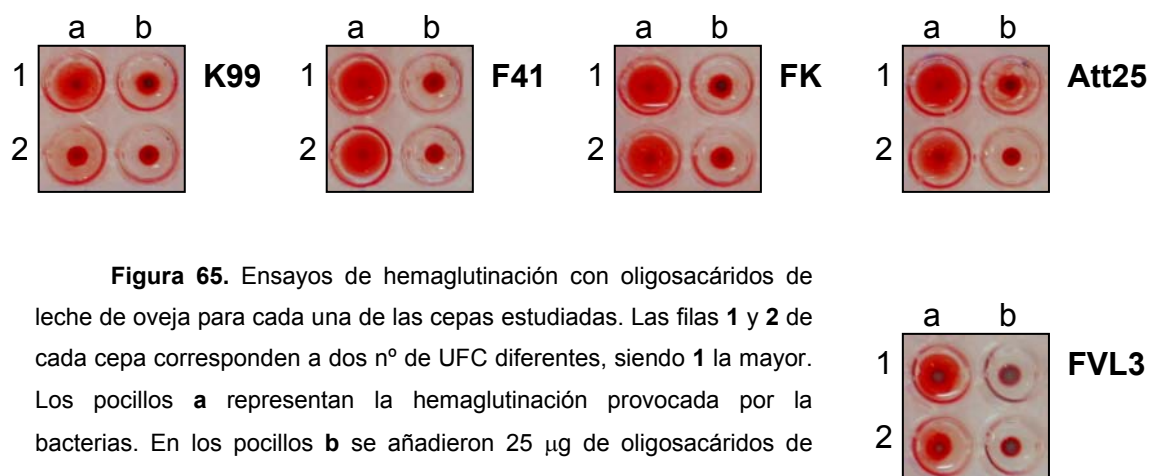


Figura 65. Ensayos de hemaglutinación con oligosacáridos de leche de oveja para cada una de las cepas estudiadas. Las filas **1** y **2** de cada cepa corresponden a dos n^o de UFC diferentes, siendo **1** la mayor. Los pocillos **a** representan la hemaglutinación provocada por la bacterias. En los pocillos **b** se añadieron 25 μ g de oligosacáridos de leche de oveja.

Blanco y Blanco (1993) describieron que tanto K99 como F41 se unían a oligosacáridos del calostro bovino y porcino. Además K99 tiene afinidad por el NeuAc y sobre todo por el NeuGc (muy abundante en todas las fracciones de la leche de oveja) (*Seignole et al.*, 1991). Por su parte F41 parece ser específica de *N*-acetilgalactosamina y Att25 reconoce *N*-acetilglucosamina, compuestos que pueden estar presentes en esta mezcla de oligosacáridos. Es lógico por tanto pensar que las adhesinas de K99, F41, FK (que contiene los dos tipos de adhesinas) y Att25 se unan a los oligosacáridos de la leche de oveja. Por otra parte la cepa FVL3 expresa la fimbria P que reconoce el residuo Gal(α 1-4)Gal (*Johnson*, 1991) que es muy similar al presente en los oligosacáridos [Gal(α 1-3)Gal].

3.8.1.2. Efecto de la 3'-sialilactosa.

Se decidió utilizar 3'-sialilactosa puesto que es un oligosacárido descrito en la leche en general y detectado en la leche de oveja. Se añadió a los pocillos para ver si ejercía algún efecto sobre la hemaglutinación.

La cantidad de 3'-sialilactosa añadida fue de 25 μ g/pocillo y no se observó ningún efecto sobre la hemaglutinación de las bacterias con ninguna de las cepas de nuestro estudio. La falta de efecto inhibitorio de la 3' SL comercial podría deberse a que contiene NeuAc como ácido siálico en su molécula y su efecto inhibitor sea pequeño o nulo. Según esto, el efecto inhibitor de la hemaglutinación ejercido por los oligosacáridos totales podría deberse fundamentalmente a las formas o especies de sialilactosa con NeuGc como ácido siálico.

3.8.1.3. Efecto de la galactosil(α 1-3)lactosa.

Se estudio también el efecto de la galactosil(α 1-3)lactosa sobre la hemaglutinación bacteriana ya que es uno de los oligosacáridos descritos en el calostro de oveja, aunque no se ha podido identificar en la leche madura.

Se utilizó la cantidad de 25 μ g/pocillo, no obteniéndose resultado alguno en ninguno de los casos para las cinco cepas estudiadas. Es posible que las cepas bacterianas usadas en este estudio no reconozcan el epítipo presente en la galactosil α 1-3lactosa o que se encuentre en cantidades muy pequeñas y su efecto sea indetectable.

3.8.2. ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN EN PLACA

Una vez realizados los ensayos de hemaglutinación bacteriana se realizaron ensayos de adhesión de las distintas cepas a gangliósidos, glicoesfingolípidos neutros y oligosacáridos de la leche de oveja en placas de cromatografía (HPTLC de aluminio) con el fin de observar si las bacterias se adherían a alguno de estos compuestos.

El protocolo seguido se describió en el apartado 2.10.2.

3.8.2.1. Inmunodetección de adhesión a gangliósidos.

En primer lugar se separaron los gangliósidos mediante cromatografía en capa fina en placas de HPTLC de aluminio utilizando el líquido de desarrollo correspondiente (C/M/H₂O, 50:45:10 (v/v), conteniendo CaCl₂ al 0.02%).

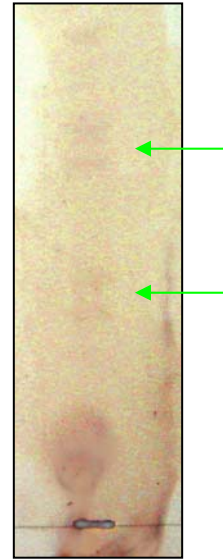
Se realizaron pruebas de adhesión a gangliósidos de las cepas K99, F41, FK y Att25.

En la figura 66 se puede observar la placa correspondiente al ensayo de adhesión con K99. En ella aparece una doble banda a la altura de GD3 y más arriba la doble banda correspondiente al GM3. Éstos son los dos gangliósidos mayoritarios en la leche de oveja. Con las otras tres cepas estudiadas no se detectó ninguna adhesión.

El GD3 no se ha descrito como receptor para la adhesión de ninguna de estas cepas, quizás el hecho de ser uno de los gangliósidos mayoritarios entre nuestros gangliósidos haga que las cepas se unan al mismo con poca especificidad. La existencia de formas de GD3 conteniendo NeuGc como ácido siálico podría ser también responsable de esta adhesión. Sin embargo, *Idota et al.* (1995) describieron adhesión bacteriana a GD3 por parte de cepas de *E. coli* enterotoxigénicas de humanos.

La adhesión a GM3 resulta lógica, ya que NeuGc-GM3 se ha descrito en numerosas ocasiones como receptor natural de K99 (*Teneberg et al.*, 1994), y nuestras muestras tienen un alto contenido en este tipo de ácido siálico.

Figura 66. Ensayo de adhesión de la cepa K99 a gangliósidos de leche de oveja.



3.8.2.2. Inmunodetección de adhesión a glicosfingolípidos neutros.

Los glicosfingolípidos neutros se separaron mediante cromatografía en capa fina en placas de HPTLC de aluminio utilizando como líquido de desarrollo C/M/H₂O, 60:35:8 (v/v).

Se realizaron pruebas de adhesión a glicosfingolípidos neutros con las cuatro cepas enterotoxigénicas de ternero y con las dos cepas uropatogénicas humanas. Decidimos utilizar éstas últimas, ya que en la bibliografía está descrito que alguna de sus fimbrias se unen a la secuencia Gal α 1-4Gal presente en la serie globo (*Johnson*, 1991).

En la figura 67 podemos observar cuatro placas HPTLC correspondientes a los ensayos de adhesión de glicosfingolípidos neutros con las cuatro cepas enterotoxigénicas de ternero.

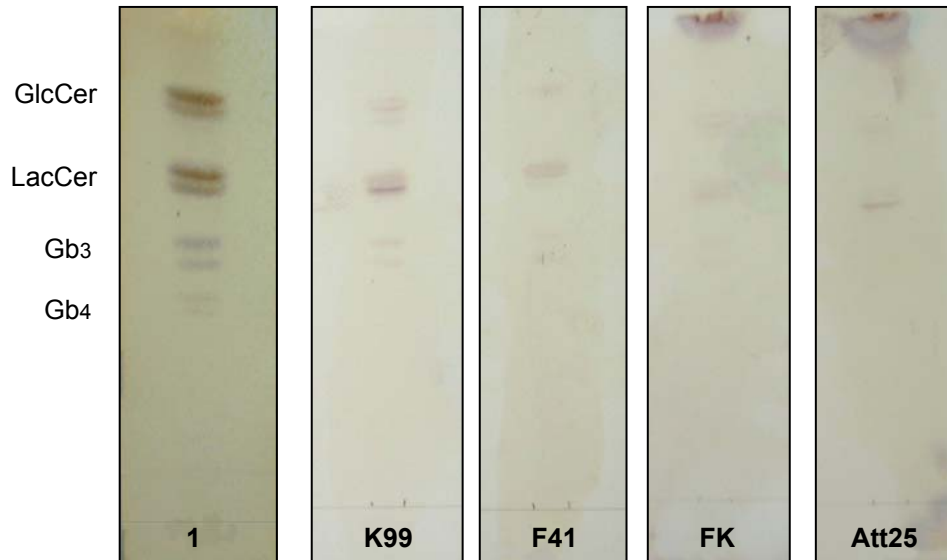


Figura 67. Ensayo de adhesión de las cepas K99, F41, FK y Att25 a glicosfingolípidos neutros. En la placa 1 se muestra el revelado químico de una muestra de glicosfingolípidos neutros. Las otras cuatro muestran el revelado inmunológico de las placas que se incubaron con bacterias.

Las cuatro cepas bacterianas mostraron capacidad de adhesión a glucosilceramida y de forma más intensa a lactosilceramida. K99 presenta una unión importante a Gb3. Las otras tres cepas también se unen a Gb3, pero de forma menos intensa. En la figura 68 podemos ver con más detalle la fuerte adhesión de K99 a Gb3, y en menor medida a Gb4. El Gb4 es el glicosfingolípidos minoritario, representando aproximadamente un 3.5% del total. Sin embargo F41 presenta mayor afinidad por el Gb4, ya que aunque la doble banda correspondiente a este glicosfingolípidos neutro es menos intensa que la correspondiente al Gb3, hay que tener en cuenta que la cantidad de este último es bastante superior. Como ya se comentó anteriormente F41 tiene especial afinidad por la *N*-acetilgalactosamina, que es precisamente el monosacárido terminal del Gb4. Con FK y Att25 apenas se aprecia la doble banda del Gb4.

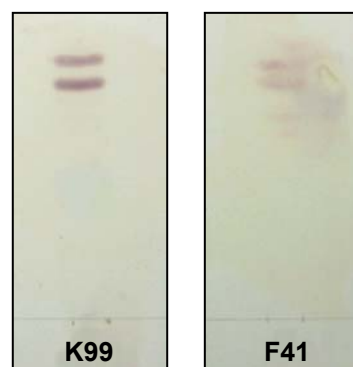


Figura 68. Detalle de la adhesión de las cepas K99 y F41 a Gb3 y Gb4.

Por otra parte quisimos probar la adhesión de dos cepas uropatogénicas humanas (FVL25 y FVL3) a los glicosfingolípidos neutros, ya que según la bibliografía Gb3 y Gb4 serían receptores a nivel uroepitelial de alguna de estas cepas (Strömberg *et al.*, 1990).

Al igual que las cepas enterotoxigénicas, las cepas uropatogénicas se unen a lactosilceramida y glucosilceramida. También comprobamos la unión de estas cepas a Gb3, corroborando así lo descrito en la bibliografía (figura 69).

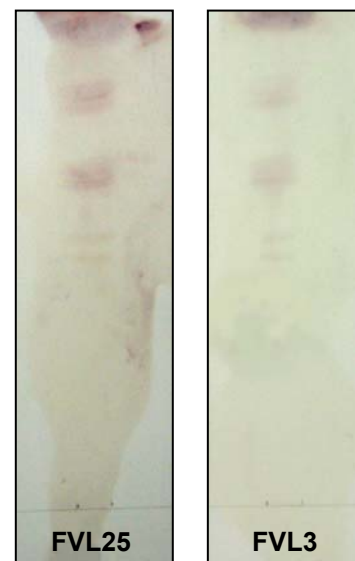


Figura 69. Ensayo de adhesión de las cepas FVL25 y FVL3 a glicosfingolípidos neutros.

Además, se realizaron controles negativos para la expresión de fimbrias cultivando las bacterias a 18°C tal y como se describe en el apartado 2.10. En algunos de los ensayos realizados se detectaron dos bandas de intensidad muy débil a la altura de GlcCer y LacCer en las placas de control negativo. En todos los casos esta banda presentó una intensidad mucho menor que la detectada en la placa de las bacterias que se habían cultivado a 37°C y que expresan las fimbrias. Este fenómeno puede ser consecuencia del tipo de cepas utilizadas, ya que al ser todas de tipo silvestre, es posible que aún cultivándose a 18°C expresen algún tipo de adhesina en superficie y se produzca la adhesión a glicolípidos.

3.8.2.3. Inmunodetección de oligosacáridos.

Los oligosacáridos de la leche humana pueden funcionar como análogos estructurales solubles de receptores de patógenos, como ya vimos anteriormente (apartado 1.6.). Por ello decidimos comprobar si alguna de las cepas de nuestro estudio, en concreto K99, FVL25 y FVL3, se adhería a los oligosacáridos separados en HPTLC.

En primer lugar se separaron los oligosacáridos en placas HPTLC de aluminio utilizando como líquido de desarrollo butanol/etanol/H₂O/ácido acético/piridina, 5:50:15:1.5:5 (v/v).

A pesar de que los ensayos de inhibición de la hemaglutinación con los oligosacáridos habían sido positivos, en este caso no obtuvimos ningún resultado satisfactorio. Es posible que la disposición en una placa de HPTLC de gel de sílice de moléculas muy hidrofílicas como los oligosacáridos produzca conformaciones espaciales de éstos diferentes a las obtenidas en solución y que no son reconocidas por las bacterias.

3.9. RESUMEN

A lo largo de estas páginas se han expuesto los resultados de nuestro estudio sobre ciertos aspectos de la composición química de la leche de oveja y la implicación de algunos de sus componentes en la defensa no especializada del lactante.

Lo primero que hicimos fue valorar el extracto seco y el contenido de grasa de nuestra leche. Comprobamos que, como se describe en la bibliografía, la leche de oveja tiene un extracto seco y un contenido graso mayor que la leche de otros rumiantes, como la vaca y la cabra.

A continuación se llevó a cabo un análisis del contenido de ácidos siálicos totales y de cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados (oligosacáridos, glicoproteínas y caseínas). También se valoró el contenido de ácidos siálicos libres. Los ácidos siálicos parecen ser esenciales para el reconocimiento bacteriano. En cada una de las fracciones estudiadas se identificaron tres especies de ácidos siálicos distintas, siendo el NeuGc el mayoritario en todas ellas, con un 74% aproximadamente. Este resultado es muy interesante, ya que el NeuGc parece muy importante en los procesos de adhesión de ciertas bacterias patógenas, como *E. coli* K99. Además este valor es muy superior al de la leche de vaca. También es importante señalar que la leche humana no contiene NeuGc.

Después llevamos a cabo el estudio de los glicolípidos. En primer lugar se analizaron los glicoesfingolípidos ácidos, los gangliósidos, compuestos que portan al menos un ácido siálico en su molécula. Primero se cuantificaron (como ácidos siálicos unidos a lípidos), y posteriormente se separaron mediante HPTLC. Se identificaron mediante comparación de su movilidad relativa con patrones conocidos y con el uso de anticuerpos monoclonales. Los gangliósidos más abundantes resultaron ser GD3 con un 62% y GM3 con un 21% aproximadamente.

En la figura 70 están representados los porcentajes de cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados incluyendo los gangliósidos.

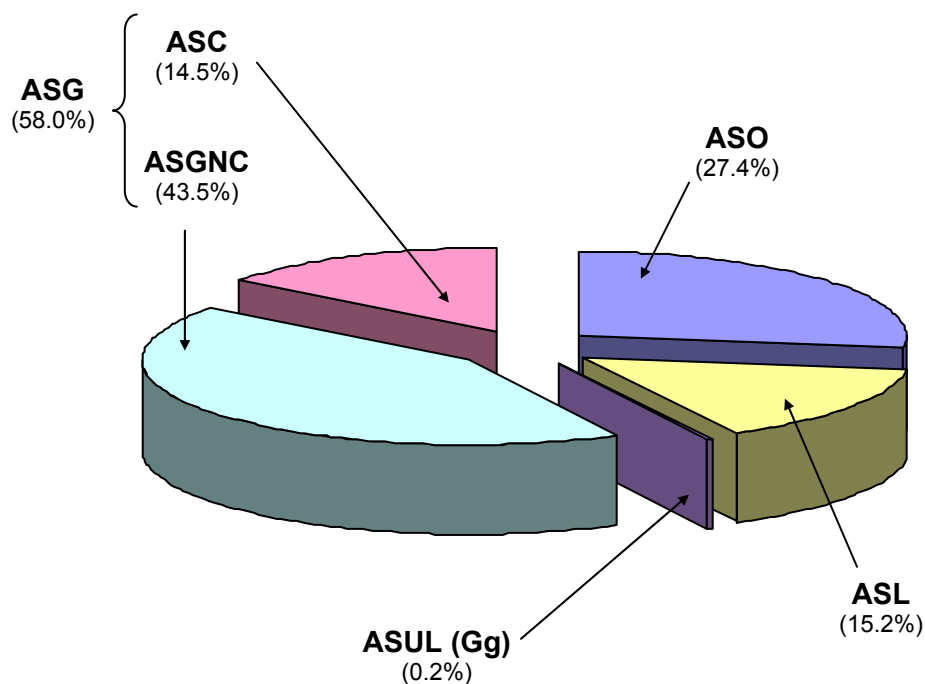


Figura 70. Porcentaje de cada una de las fracciones de sialoglicoconjugados de la leche de oveja.

Para completar el estudio de los glicoesfingolípidos se realizó un análisis de los glicoesfingolípidos neutros. Se valoraron y se separaron mediante HPTLC. Se identificaron por comparación de su movilidad relativa con la de patrones conocidos, utilizando anticuerpos monoclonales, y con el uso de una serie de pruebas enzimáticas. Se identificaron cinco especies diferentes. Las más abundantes fueron glucosilceramida y lactosilceramida, ya descritas en la leche de vaca. También se encontraron pequeñas cantidades de galactosilceramida, muy abundante en la leche humana. Por último pudimos detectar la presencia de Gb3 y Gb4. Estas dos especies no aparecen en la leche de vaca, pero sí están descritas en la leche humana. Además se estudió su composición de ácidos grasos mediante la formación de ésteres metílicos. El resultado fue un perfil muy característico con un elevado porcentaje de ácidos grasos de cadena muy larga (C22-C24).

Tras realizar el estudio de los glicoesfingolípidos se llevó a cabo el análisis de los fosfolípidos. Se separaron mediante TLC bidimensional y unidimensional, se identificaron por comparación de su movilidad relativa con la de patrones comerciales y se cuantificaron tanto en conjunto como de forma individual. Se realizó también el estudio de su composición en ácidos grasos. El perfil de los ácidos grasos de los

fosfolípidos totales resultó muy diferente al de los glicoesfingolípidos neutros, con un porcentaje mucho menor de ácidos grasos de cadena muy larga, pero con un porcentaje bastante superior de ácidos grasos insaturados. Al estudiar el perfil de los ácidos grasos de cada fosfolípido individual pudimos observar que el de la esfingomielina era muy diferente al del resto de los fosfolípidos y muy similar al de los glicoesfingolípidos neutros. Hay que tener en cuenta que la esfingomielina es un fosfolípido que comparte estructura con los glicoesfingolípidos.

Para finalizar con el estudio de la composición química de la leche de oveja, decidimos llevar a cabo algunos análisis de oligosacáridos. Tras su obtención y purificación, se separaron mediante HPTLC utilizando dos técnicas diferentes y se comparó su movilidad relativa con la de patrones comerciales. Se intentó su identificación mediante HPAEC-PAD y espectrometría de masas. Apoyándonos en los datos encontrados en la bibliografía podemos confirmar la presencia de sialilactosa en la leche madura, con predominancia de la especie que contiene NeuGc.

Una vez estudiados estos aspectos sobre la composición química de la leche de oveja, decidimos completar nuestro trabajo tratando de comprobar la implicación de algunos de sus componentes en la defensa del neonato, participando como falsos receptores de patógenos. Primero se realizaron ensayos de adhesión bacteriana con eritrocitos de caballo y de ovino. Se utilizaron varias cepas distintas de *E. coli* [cuatro enteropatógenicas (ETEC) y dos uropatógenicas (UPEC)]. Una vez comprobada la capacidad hemaglutinante de las cepas se introdujeron en los ensayos distintos compuestos para ver si afectaban o no esta capacidad hemaglutinante. De todos los compuestos utilizados se obtuvieron resultados concluyentes con los oligosacáridos de la leche de oveja, que inhibieron la hemaglutinación con todas las cepas estudiadas.

Por último se realizaron ensayos de adhesión de las distintas cepas a glicolípidos y oligosacáridos de la leche de oveja separados mediante cromatografía en placas de HPTLC. En primer lugar pudimos observar la adhesión de K99 a GD3 y GM3. Como ya se ha comentado antes en esta memoria, en todos los compuestos sialilados de la leche de oveja el NeuGc es muy abundante, y el NeuGc-GM3 ha sido descrito como punto de adhesión para esta cepa en concreto.

Por otra parte se detectó adhesión de todas las ETEC a glucosilceramida y lactosilceramida. K99 y F41 presentaron adhesión a Gb3 y Gb4. La adhesión a Gb3 fue

importante en el caso de K99, mientras que F41 presentó mayor afinidad por Gb4. Con las dos cepas uropatogénicas estudiadas también se observó adhesión a GlcCer, LacCer y Gb3.

Para finalizar se hicieron ensayos de adhesión de las cepas uropatogénicas humanas a oligosacáridos de la leche de oveja, pero los resultados obtenidos fueron negativos.

4

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La leche de oveja tiene un elevado contenido de ácido *N*-glicolineuramínico (NeuGc) en todas las fracciones de sialoglicoconjugados estudiadas.
2. La leche de oveja presenta además un contenido de glicoesfingolípidos neutros muy similar a la leche humana con cantidades muy significativas de Gb3 y Gb4.
3. Los glicoesfingolípidos neutros de la leche de oveja tienen una proporción elevada de ácidos grasos de cadena muy larga (mayores de veinte carbonos), incluso mayor que la leche de vaca.
4. Los oligosacáridos, gangliósidos y glicoesfingolípidos neutros de la leche de oveja son capaces de unirse a algunas cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas para terneros y uropatogénicas para humanos, además de bloquear su capacidad hemaglutinante.

5

Bibliografia

5. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aminoff, D.** (1961). Methods for quantitative estimation of *N*-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.* **81**: 384-392

2. **Andersson, B., Porrás, O., Hanson, L. A., Lagergard, T., and Svanborg-Eden, C.** (1986). Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J. Infect. Dis.* **153**: 232-237

3. **Anifantakis, E. M.** (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewes' and cows' milk. *Boletín of the IDF.* **202**: 42-53

4. **Assenat, L.** (1991). Leche de oveja: Composición y propiedades. En: La leche. De la mama a la lechería. (F. M. Luquet ed.) Ed Acribia, Zaragoza, pp. 277-313

5. **Astaire, J. C., Ward, R., German, J. B. and Jiménez-Flores, R.** (2003). Concentration of polar MFGM lipids from buttermilk by microfiltration and supercritical fluid extraction. *J. Dairy Sci.* **86**: 2297-2307

6. **Barber, A. J. and Jamieson, G. A.** (1970). Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* **245**: 6357-6365

7. **Basu, S., Basu, M., Chien, J. L., and Prosper, K. A.** (1980). Biosynthesis of gangliosides in tissues. En: Structure and function of gangliosides (Svennerholm, L., Dreyfus, H., Urban, P. E. eds.) Plenum Publ. Press, New York, pp. 213-226

8. **Blanco, J. y Blanco, M.** (1993). *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Servicio de Publicaciones Diputación Provincial de Lugo

9. **Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Mora, A., Balsalobre, C., Muñoa, F., Juárez, A. and Blanco, J.** (1997). Detection of *pap*, *sfa* and *fa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Res. Microbiol.* **148**: 745-755

10. **Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Alonso, M., González, E. y Bernárdez, M.** (2002). Enterobacterias: características generales. En: Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana; S. Vadillo, S. Piriz, y E. Mateos (ed.). Madrid, pp. 301-325
11. **Blum, A. S. and Barnstable, C. J.** (1987). O-acetylation of a cell-surface carbohydrate creates discrete molecular patterns during neutral development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 8716-8720
12. **Brennan, M. J., Hannah, J. H., and Leiniger, E.** (1991). Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAcBeta4Gal sequence found in glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.* **266**: 18827-18831
13. **Brennan, M. J., Joralmon, R. A., Cisar, J. O., and Sandberg, A. L.** (1987). Binding of *Actinomyces naeslundii* to glycosphingolipids. *Infect. Immun.* **55**: 487-489
14. **Broekhuysse, R. M.** (1969). Quantitative two-dimensional thin-layer chromatography of blood phospholipids. *Clim. Chim. Acta* **23**: 457-461
15. **Brunner, J. R.** (1974). Physical equilibrium in milk : the lipid fase. En: Fundamentals in dairy chemistry. (B. H. Webb, A. H. Johnson, and J. A. Alford, eds.) AVI. Westport. Pags
16. **Cabezas et al, J. A., Reglero, A., García Alonso, J., Rodrigo, M., Martínez-Zorzano, V. S., Cabezas-Delamare, M., Fitt, H., y Hueso, P.** (1989). Gangliósidos: datos recientes sobre sus características, funciones y aplicaciones terapéuticas. *Jano.* **870**: 43-49
17. **Campo, M. M., Santaliestra, A. M., Lara, P., Fleta, J., Sañudo, C. y Moreno, L. A.** (2008). El cordero en la dieta española. *Alim. Nutri. Salud* **15**: 54-59
18. **Carlson, S. E.** (1985). N-acetyl-neuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* **41**: 720-726

19. Carr, A., Mullet, A., Mazorra, Z., Vázquez, A. M., Alfonso, M., Mesa, C., Rengifo, E., Pérez, R. and Fernández, L. E. (2000). A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for *N*-glycolil GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* **19**: 241-247

20. Cole, R. N., and Hart, G. W. (1997). Glycosyl-phosphatidylinositol anchors: structure, biosynthesis and function. En: Glycoproteins II. (Montreuil, J., Vliegenthart, J., and Schachter, H., eds.) Elsevier Science B. V., Amsterdam, pp.69-88

21. Coppa, G. V., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A., and Gabrielli, O. (1999). Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr.* **430** suppl: 89-94

22. Dai, D., Nanthkumar, N. N., Newburg, D. S. and Walter, W. A. (2000). Role of oligosaccharides and glycoconjugates in intestinal host defense. *J. Paediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**: 523-533

23. Deal, C. D., and Krivan, H. C. (1990). Lacto- and ganglio-series glycolipids are adhesion receptors for *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 12774-12777

24. De Graaf, F. K. and Mooi, F. R. (1986). The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.* **28**: 65-143

25. Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K. and Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* **18**: 436-457

26. Dickson, J. J., and Messer, M. (1978). Intestinal neuraminidase activity of suckling rats and other mammals. Relationship to the sialic acid content of milk. *Biochem. J.* **170**: 407-413

27. Dubois, C., Manuguerra, J. C., Hauttecoeur, B. and Maze, J. (1990). Monoclonal antibody A2B5, which detects cell surface antigens, binds to ganglioside GT3 (II3(NeuAc)3LacCer) and to its 9-O-acetylated derivate. *J. Biol. Chem.* **265**: 2797-2803

-
28. **Duguid, J. P., Smith, I. W., Dempster, G. and Edmunds, P. N.** (1955). Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* **70**: 335-348
29. **Engfer, M. B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., and Daniel, H.** (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 1589-1596
30. **Evans, D. J., Evans, D. G. and DuPont, H. L.** (1979). Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect. Immun.* **23**: 336-346
31. **Fantini, J., Maresca, M., Hammache, D., Yahi, N. and Delézay, O.** (2000). Glycosphingolipid (GSL) microdomains as attachment platforms for host pathogens and their toxins on intestinal epithelial cells: Activation of signal transduction pathways and perturbations of intestinal absorption and secretion. *Glycoconj. J.* **17**: 173-179
32. **FAO.** www.fao.org
33. **Fried, B.** (1996). Lipids. En: Handbook of thin-layer chromatography. (J. Sherma and B. Fried eds.). Ed. Marcel Dekker, New York. Vol. 71, pp. 683-714
34. **Gal, B., Ruano, M. J., Puente, R., García-Pardo, L. A., Rueda, R., Gil, A. and Hueso, P.** (1997). Developmental changes in UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase activity of rat and guinea-pig liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **118B**: 13-15
35. **Ganguli, N. C.** (1971). Chemical and microbiological composition of ewe's and goat's milks and influence on the processing of these milks. IDF Seminar on Milks Other than Cow's Milk. Madrid (Spain). 27-28 April
36. **Giraud, C. G., Daniotti, J. L., and Maccioni, H. J.** (2001). Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 1625-1630

37. **Gnoth, M. J., Rudloff, S., Kunz, C., and Kinne, R. K. H.** (2001). Investigations of the *in vitro* transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J. Biol. Chem.* **276**: 34363-34370
38. **González-Llano, D., y Ramos, M.** (1989). Composición química de la leche de oveja. *OVIS.* **17**: 9-19
39. **Gopal, P. K., and Hill, H. S.** (2000). Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* **84**: 569-574
40. **Guinee, P. A., Veldkamp, J. and Jansen, W. H.** (1977). Improved minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **15**: 676-678
41. **Gupta, M., Schwarz, J., Chen, X. L., and Roisen, F. J.** (1990). Gangliosides prevent MPTP toxicity in mice: An immunocytochemical study. *Brain Res.* **527**: 330-334
42. **György, P., Norris, R. F. and Rose, C. S.** (1954). Bifidus factor I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **48**: 193-201
43. **Hacker, J.** (1992). Role of fimbrial adhesions in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can. J. Microbiol.* **38**: 720-727
44. **Hakomori, S. I.** (1991). Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J. Biol. Chem.* **265**: 18713-18716
45. **Hakomori, S. I.** (2000). Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipids microdomain. *Glycoconj. J.* **17**: 143-151
46. **Hannun, Y. A. and Obeid, L. M.** (2002). The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* **277**: 25847-25850

-
47. **Haywood, A. M., and Boyer, B. P.** (1986). Ficoll and dextran enhance adhesion of Sendai virus to liposomes containing receptor (Ganglioside GD1a). *Biochemistry* **25**: 3925-3929
48. **Heid, H. W. and Keenan, T. W.** (2005). Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur. J. Cell Biol.* **84**: 245-258
49. **Heinrichs, A. J., Wells, S. J. and Losinger, W. C.** (1995). A study of the use of milk replacers for dairy calves in the United States. *J. Dairy Sci.* **78**: 2831-2837
50. **Hernández, M., Martínez, M., Ciria, J., y Asenjo, B.** (2000). Producción mundial de leche y huevos. *Mundo Ganadero* **121**
51. **Heyningen, W. E. Van, Carpenter, C. C. J., Pierce, N. F., and Greenough.** (1971). Deactivation of cholera toxin by ganglioside. *J. Infect. Dis.* **124**: 415-418
52. **Hoessli, D. C., Ilangumaran, S., Soltermann, A., Robinson, P. J., Borisch, B. and Nasir-Ud-Din.** (2000). Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: The concept of signaling platform. *Glycoconj. J.* **17**: 191-197
53. **Hoonton, T. M. and Stamm, W. E.** (1997). Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **11**: 551-581
54. **Huang, R. T. C.** (1973). Isolation and characterization of the gangliosides of butter milk. *Biochim. Biophys. Acta* **306**: 82-84
55. **Hueso, P., Cabezas, J. A., and Reglero, A.** (1988). O-acetylated sialic acids in gangliosides from pig spleen lymphocytes. *Ital. J. Biochem.* **37**: 302-309
56. **Hull, R. A., Hull, S. I. and Falkow, S.** (1984). Frequency of gene sequences necessary for pielonephritis-associated pili expression among isolates of Enterobacteriaceae from human extraintestinal infections. *Infect. Immun.* **43**: 1064-1067

57. **Huwiler, A., Kolter, A., Pfeilschifter, J., and Sandhoff, K.** (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1485**: 63-69
58. **Idota, T. and Kawakami, H.** (1995). Inhibitory effects of milk gangliosides on the adhesion of *Escherichia coli* to human intestinal carcinoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 69-72
59. **Ito, M., and Yamagata, T.** (1986). A novel glycosphingolipid-degrading enzyme cleaves the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.* **261**: 14278-14282
60. **IUPAC-IUB.** (1999). Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of glycolipids. *Recommendations 1997. Glycoconj. J.* **16**: 1-6
61. **Iwamori, M., Takamizawa, K., Momoeda, M., Iwamori, Y. and Taketani, Y.** (2008). Gangliosides in human, cow and goat milk, and their abilities as to neutralization of cholera toxin and botulinum type A neurotoxin. *Glycoconj. J.* **25**: 675-683
62. **Jiménez, M. A., Serrano, M. y Jurado, J. J.** (2005). La raza Assaf española en la provincia de León. Situación actual de la raza. *ITEA.* **102**: 117-128
63. **Johanson, I. M., Plos, K., Marklund, B. I. and Svanborg, C.** (1993). Pap, pap G, and prsG DNA sequences in *Escherichia coli* from the fecal flora and the urinary tract. *Microb. Pathog.* **15**: 121-129
64. **Johnson, J. R.** (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 80-128
65. **Johnson, J.** (1994). Host-pathogen interactions in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **7**: 287-294
66. **Jollès, J., and Fiat, A. M.** (1979). The carbohydrate portions of milk glycoproteins. *J. Dairy Res.* **46**: 187-191

67. **Juárez, M., Martínez-Castro, I., Ramos, M., Méndez, A., y Martín-Álvarez, P. J.** (1978). Estudio sobre la composición de la leche de vaca en España. Instituto de Productos Lácteos, CSIC, España
68. **Juárez, M., Ramos, M., Goicoechea, A., and Jiménez-Pérez, S.** (1984). Main components, nitrogen fractions and mineral elements of Manchega ewes' milk. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **8**: 143
69. **Karlsson, K. A. and Stromberg, N.** (1987). Overlay and solid-phase analysis of glycolipid receptors for bacteria and viruses. *Methods Enzymol.* **138**: 220-232
70. **Kaufmann, W., and Hagemester, H.** (1987). Composition of milk. En: Dairy-cattle production. H. O. Gravert, ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp 107-171
71. **Keenan, T. W.** (1974). Composition and synthesis of gangliosides in mammary gland and milk of the bovine. *Biochim. Biophys. Acta* **337**: 255-270
72. **Keenan, T. W., Huang, C. M., and Morre, D. J.** (1972a). Gangliosides in milk fat globule membrane and mammary gland. *J. Dairy Sci.* **55**: 662
73. **Keenan, T.W., Huang, C. M., and Morre, D. J.** (1972b). Gangliosides: Nonspecific localization in the surface membranes of bovine mammary gland and rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**: 1277-1283
74. **Kolodny, E. H., Kanfer, J., Quirk, J. M., and Brady, R. O.** (1971). Properties of a particle-bound enzyme from rat intestine that cleaves sialic acid from Tay-Sachs ganglioside. *J. Biol. Chem.* **246**: 1426-1431
75. **Kolter, T., Proia, R. L., and Sandhoff, K.** (2002). Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 25859-25862
76. **Kozaki, S., Ogasawara, J., Shimote, Y., Kamata, Y., and Sakaguchi, G.** (1987). Antigenic structure of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin and its interaction with gangliosides, cerebroside, and free fatty acids. *Infect. Immun.* **55**: 3051-3056

77. **Kuhar, I., Grabner, M. and Bertok, D. Z.** (1998). Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 243-248

78. **Kuhn, R., and Brossmer, R.** (1954). Über die Prosthetische Gruppe der Mucoproteine des Kuhcolostrums. *Chem. Ber.* **87**: 123-125

79. **Kunz, C. and Rudloff, S.** (1993). Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr.* **82**: 903-912

80. **Kunz, C. and Rudloff, S.** (2006). Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *Int. Dairy J.* **16**: 1341-1346

81. **Kunz, C., Rudloff, S., Hintelmann, A., Pohlentz, G. and Egge, H.** (1996). High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *J. Chromatogr. B.* **685**: 211-221

82. **Kunz, C., Rudloff, S., Schad, W. and Braun, D.** (1999). Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br. J. Nutr.* **82**: 391-399

83. **Kyogashima, M., Ginsburg, V. and Krivan, H. C.** (1989). *Escherichia coli* K99 binds to *N*-glycolylsialoparagloboside and *N*-glycolyl-GM3 found in piglet small intestine. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**: 391-397

84. **Lindahl, M. and Wadstrom, T.** (1984). K99 surface haemagglutinin of enterotoxigenic *E. coli* recognize terminal *N*-acetylgalactosamine and sialic acid residues of glycophorin and other complex glycoconjugates. *Vet. Microbiol.* **9**: 249-257

85. **López-Fandiño, R., Acedo, M. I., and Ramos, M.** (1993). Comparative study by HPTLC of caseinopeptides from cows', ewes' and goats' milk. *J. Dairy Res.* **60**: 117-121

86. **Maccioni, H. J., Daniotti, J. L., and Martina, J. A.** (1999). Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **1437**: 101-118

87. **Magnani, J. L., Smith, D. F. and Ginsburg, V.** (1980). Detection of gangliosides that bind cholera toxin : direct binding of ¹²⁵I-labeled toxin to thin-layer chromatograms. *Anal. Biochem.* **109**: 399-402
88. **Mancini, G. M. S., de Jonge, H. R., Galjaard, H., and Verheijen, F. W.** (1989). Characterization of proton-driven carrier of sialic acid in the lysosomal membrane. Evidence for a group specific transport system for acidic monosaccharides. *J. Biol. Chem.* **264**: 15247-15250
89. **Mantecón, A. R., Díez, P., Villadangos, B., Martínez, Y. y Lavín, P.** (2007). Tamaño del rebaño e importancia de los factores productivos en los sistemas de producción ovina de leche de León (España). XXXII Jornadas científicas y XI Jornadas internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Mallorca. SEOC.
90. **MAPA.** www.mapa.es
91. **Martín, M. J., Martín-Sosa, S., Alonso, J. M., and Hueso, P.** (2003). Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains bind bovine milk gangliosides in a ceramide-dependent process. *Lipids* **38**: 761-768
92. **Martín, M. J., Martín-Sosa, S., García-Pardo, L. A., and Hueso, P.** (2001). Distribution of bovine milk sialoglycoconjugates during lactation. *J. Dairy Sci.* **84**: 995-1000
93. **Martina, J. A., Daniotti, J. L., and Maccioni, H. J.** (1998). Influence of *N*-glycosylation and *N*-glycan trimming on the activity and intracellular traffic of GD3 synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 3725-3731
94. **Martínez, R. S., Ruíz, A., Chico, M. D., Anel, L., Álvarez, M. M., Jurado, J. J., Díaz, C., Pérez, J., y Aparicio, N.** (1999). Antecedentes históricos y bases de un programa de mejora genética y selección de la raza Assaf española. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pp. 37

95. **Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C. A., Pohlentz, G., Boza, J. J., Guadix, E. M. and Kunz, C.** (2006). Goat's milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *Int. Dairy J.* **16**: 173-181
96. **Martín-Sosa, S., Martín, M. J., Castro, M. D., Cabezas, J. A., and Hueso, P.** (2004a). Lactational changes in the fatty acid composition of human milk gangliosides. *Lipids* **39**: 111-116
97. **Martín-Sosa, S., Martín, M. J., García-Pardo, L. A., and Hueso, P.** (2003). Sialyloligosaccharides in human and bovine milk and in infant formulas: variations with the progression of lactation. *J. Dairy Sci.* **86**: 52-59
98. **Martín-Sosa, S., Martín, M. J., García-Pardo, L. A., and Hueso, P.** (2004b). Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **39**: 499-503
99. **Martín-Valmaseda, E. M., Sánchez-Yague, J., Hernández-Hernández, A. and Llanillo, M.** (1998). Vesiculation and changes in fluidity and lipid composition of platelet membranes alter storage of sheep platelets in plasma or Seto solution. *Thromb. Haemost.* **80**: 668-676
100. **Matyas, G. R., and Morré, J.** (1987). Subcellular distribution and biosynthesis of rat liver gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* **921**: 599-614
101. **Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R.** (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* **38**: 514
102. **Miguel, M., Manso, M. A., López-Fandiño, R., Alonso, M. J. and Salices, M.** (2007). Vascular effects and antihypertensive properties of κ -casein macropeptide. *Int. Dairy J.* **17**: 1473-1477
103. **Moreno, E., Lanne, B., Vázquez, A. M., Kawashima, I., Tai, T., Fernández, L. E., Karlsson, K. A., Angstrom, J. and Pérez, R.** (1998). Delineation of the epitope recognized by an antibody specific for *N*-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *Glycobiology* **8**: 695-705

104. **Moreno, F. J., Recio, I., Olano, A., and López-Fandiño, R.** (2000). Chromatographic characterization of ovine κ -casein macropeptide. *J. Dairy Res.* **67**: 349-359
105. **Morrissey, P. A.** (1973). *N*-Acetyl neuraminic-acid content of milk of various species. *J. Dairy Res.* **40**: 421-425
106. **Morrison, W. R.** (1968). The distribution of phospholipids in some mammalian milks. *Lipids* **3**: 101-103
107. **Morrison, W. R. and Smith, L. M.** (1967). Fatty acid composition of milk phospholipids. II. Sheep, Indian buffalo and human milks. *Lipids* **2**: 178-182
108. **Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martínez, J. J. and Hultgrem, S. J.** (2000). Bad bugs and beleagued bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **16**: 8829-8835
109. **Muthing, J.** (1996). High-resolution thin-layer chromatography of gangliosides. *J. Chromatogr. A.* **720**: 3-25
110. **Nakamura, T., Urashima, T., Nakagawa, M., and Saito, T.** (1998). Sialyllactose occurs as free lactones in ovine colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* **1381**: 286-292
111. **Neeser, J. R., Golliard, M., and Del Vedovo, S.** (1991). Quantitative-determination of complex carbohydrates in bovine-milk and in milk-based infant formulas. *J. Dairy Sci.* **74**: 2860-2871
112. **Newburg, D. S.** (1999). Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr. Med. Chem.* **6**: 117-127
113. **Newburg, D. S.** (2000). Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**: S8-S17
114. **Newburg, D. S. and Chaturvedi, P.** (1992). Neutral glycolipids of human and bovine milk. *Lipids* **27**: 923-927

115. **Newburg, D. S., Ruiz-Palacios, G. M. and Morrow, A. L.** (2005). Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu. Rev. Nutr.* **25**: 37-58
116. **Noh, S. K. and Koo, S. I.** (2004). Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *J. Nutr.* **134**: 2611-2616
117. **Nollet, H., Laevens, H., Deprez, P., Sánchez, R., Van Dierseche, E. and Muyelle, E.** (1999). The use of non-immune plasma powder in the prophylaxis of neonatal *Escherichia coli* diarrhoea calves. *J. Vet. Med. A.* **46**: 185-196
118. **Nomurova, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Imokawa, G., Dohmae, N., Takio, K., Hattori, M., and Matsuo, N.** (1998). Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: Glucosylceramide, β -1,4-galactosyltransferase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **273**: 13570-13577
119. **Otnaess, A-B. K., Laegrid, A., and Ertresvag, K.** (1983). Inhibition of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio Cholerae* by gangliosides from human milk. *Infect. Immun.* **40**: 563-569
120. **Parkash, S., and Jenness, R.** (1968). The composition and characterization of goats' milk. A review. *Dairy Sci. Abstr.* **30**: 67-87
121. **Pintos, G.** (2002). Enfermedad de Fabry: reconocimiento en la edad pediátrica. *An. Esp. Pediatr.* **57**: 45-50
122. **Pollot, G. E., and Gootwine, E.** (2004). Reproductive performance and milk production of Assaf sheep in an intensive management system. *J. Dairy Sci.* **87**: 3690-3703
123. **Popov, N., Toffano, G., Riechert, U., and Matthies, H.** (1988). Effects of intraventricularly applied gangliosides and *N*-acetylneuraminic acid on acquisition and retention performance of a brightness discrimination task in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **34**: 209-212

124. **Prieto Martín, A. L.** (2004). Distribución de los sialoglicoconjugados de la leche de cabra. Trabajo de Grado de Salamanca. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca
125. **Puente, R., García-Pardo, L. A., and Hueso P.** (1992). Gangliosides in bovine-milk-changes in content and distribution of individual ganglioside levels during lactation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. **373**: 283-288
126. **Puente, R., García-Pardo L. A., Rueda, R., Gil, A., and Hueso P.** (1994). Changes in ganglioside and sialic-acid contents of goat milk during lactation. *J. Dairy Sci.* **77**: 39-44
127. **Puente, R., García-Pardo, L. A., Rueda, R., Gil, A., and Hueso, P.** (1995). Ewes milk: changes in the contents of gangliosides and sialic acid during lactation. *J. Dairy Res.* **62**: 651-654.
128. **Puente, R., García-Pardo, L. A., Rueda, R., Gil, A., and Hueso, P.** (1996). Seasonal variations in the concentration of gangliosides and sialic acids in milk from different mammalian species. *Int. Dairy J.* **6**: 315-322
129. **Puente, R., and Hueso, P.** (1993). Lactational changes in the *N*-glycolylneuraminic acid content and distribution of bovine-milk gangliosides. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. **374**: 475-478
130. **Rahman, H.** (1992). Calcium-ganglioside interactions and modulations of neuronal functions. En: Current aspects of the neurosciences. Vol 4. (N. N. Osborne, ed.), Macmillan Press, Boca Raton, FL
131. **Ramos, M. and Juárez, M.** (1981). The composition of ewe's and goat's milk. *Int. Dairy Fed. Bull. Doc.* 140. *Int. Dairy Fed.*, Brussels, Belgium.
132. **Ramos, M., y Juárez, M.** (1986). Métodos analíticos para la identificación de mezclas de leche de diferentes especies. *Revista Española de Lechería* **7**: 19

133. **Riboni, L., Bassi, R., Caminito, A., Prinetti, A., Viani, P., and Tettamanti, G.** (1998). Metabolic fate of exogenous sphingosine in neuroblastoma Neuro2A cells. Dose-dependence and biological effects. En: *Sphingolipids as Signalling Modulators in the Nervous System*, (Leeden, B. W., Hakomori, S. I., Yates, A. J., Schneider, Y. S., Yu, R. K., eds.) *Ann. NY Acad. Sci.* **845**: 46-56
134. **Rombaut, R., Camp, J. V. and Dewettinck, K.** (2005). Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *J. Dairy Sci.* **88**: 482-488
135. **Roseman, S.** (1970). The sintesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potencial function in intercellular adhesión. *Chem. Phys. Lipids* **5**: 270-297
136. **Rosengren, B., Mansson, J. E. and Svennerholm, L.** (1987). Composition of gangliosides and neutral glycosphingolipids of brain in classical Tay-Sachs and Sandhoff disease – More Lyso-Gm2 in Sandhoff disease. *J. Neurochem.* **49**: 834-840
137. **Rouser, G., Fkeischer, S. and Yamamoto, A.** (1970). Two dimensional thin layer chromatography separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**: 494-496
138. **Saito, M. and Sugiyama, K.** (2000). Tissue-specific expresion of c-series gangliosides in the extraneural system. *Biochem. Biophys. Acta* **1474**: 88-92
139. **Sánchez Juanes, F.** (2007). Glicolípidos y fosfolípidos de la membrana de los glóbulos de grasa de la leche de vaca y su implicación en la protección del neonato frente a enteropatógenos. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca
140. **Schaeffer, A. J., Rafan, N., Cao, Q., Anderson, B. E., Prudens, A. L., Sensibar, J. and Duncan, J. L.** (2001). Host pathogenesis in urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **17**: 245-251
141. **Schauer, R.** (2000). Achievements and challenges of sialic acids research. *Glycoconj. J.* **14**: 485-499

142. **Schlosshauer, B., Blum, A. S., Méndez-Otero, R., Barnstable, C. J. and Constantine-Paton, M.** (1988). Developmental regulation of ganglioside antigens recognized by the JONES antibody. *J. Neurosci.* **8**: 580-592
143. **Schroten, H., Stapper, C., Plogmann, R., Köhler, H., Hacker, J. and Hanisch, F. F.** (1998). Fab-independent antiadhesion effects of secretory immunoglobulin A on S-fimbriated *Escherichia coli* are mediated by sialyloligosaccharides. *Infect. Immun.* **66**: 3971-3973
144. **Schweppe, C. H., Bielaszewska, M., Pohlentz, G., Friedrich, A. W., Büntemeyer, H., Schmidt, M. A., Kim, K. S., Peter-Katalinié, J., Karch, H. and Muthing, J.** (2008). Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: relationship of heterogeneity in Gb3Cer/CD77 receptor expression with differential Shiga toxin 1 cytotoxicity. *Glycoconj. J.* **25**: 291-304
145. **Scout, E. P. and Slichter, S. J.** (1980). Viability and function of platelet concentrates stored in CPD-adenine (CPDA-1). *Transfusion* **20**: 489-497
146. **Seignole, D., Mouricout, M., Duval-Iflah, Y., Quintard, B. and Julien, R.** (1991). Adhesion of K99 fimbriated *Escherichia coli* to pig intestinal epithelium: correlation of adhesive and non-adhesive phenotypes with the sialoglycolipid content. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1591-1601
147. **Simons, K., and Ikonen, E.** (1999). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-592
148. **Skaper, S. D., Facci, L., and Leon, A.** (1990). Gangliosides attenuate the delayed neurotoxicity of aspartic acid in vitro. *Neurosci. Lett.* **117**: 154-159
149. **Strömberg, N., Merkland, B., Lund, B., Ilver, D., Hamers, A., Gaastra, W., Karlsson, K. A. and Normark, S.** (1990). Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal α 1-4Gal-containing isoreceptors. *EMBO J.* **9**: 2001-2010

150. **Superti, F., Hauttecoeur, B., Morelec, M. J., Goldini, P., Bizzini, B., and Tsiang, J.** (1986). Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J. Gen. Virol.* **67**: 47-56

151. **Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Guiyun, X., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Tamada, A., Sugawara, K., Nishimura, H., Kitame, F., Nakamura, K., Deya, E., Kiso, M., and Hasegawa, A.** (1992). Structural determination of gangliosides that bind to influenza A, B, and C viruses by an improved binding assay: strain-specific receptor epitopes in sialo-sugar chains. *Virology* **189**: 121-131

152. **Suzuki, Y., Suzuki, T., Matsunaga, M., and Matsumoto, M.** (1985). Gangliosides as paramyxovirus receptor. Structural requirement of sialio-oligosaccharides in receptors for hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus) and Newcastle disease virus. *J. Biochem.* **97**: 1189-1199

153. **Svejar, J., Ehrlich-Rogozinski, S., Riedel, D., Muthing, J. and Sharon, N.** (1993). Developmental changes in neutral glycosphingolipids of mouse placenta. *Glycoconj. J.* **10**: 247-250

154. **Svennerholm, L.** (1957). Quantitative estimation of sialic acids .2. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim. Biophys. Acta* **24**: 604-611

155. **Svennerholm, L.** (1958). Quantitative estimation of sialic acids .3. An anion exchange resin method. *Acta Chem. Scand.* **12**: 547-554

156. **Svennerholm, L.** (1963). Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* **10**: 613-623

157. **Tai, T., Kawashima, I., Furukawa, K and Lloyd, K. O.** (1988). Monoclonal antibody R24 distinguishes between different *N*-acetyl- and *N*-glycolylneuraminic acid derivatives of ganglioside GD3. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 51-55

158. **Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., and Muchmore, E.** (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **21**: 12045-12050

159. **Teneberg, S., Willemsen, P. T., de Graaf, F. K., Stenhagen, G., Pimlott, W., Jovall, P. A., Angstrom, J. and Karlsson, K. A.** (1994). Characterization of gangliosides of epithelial cells of calf small intestine, with special reference to receptor-active sequences for enteropathogenic *Escherichia coli* K99. *J. Biochem. (Tokyo)* **116**: 560-574
160. **Tettamanti, G.** (2004). Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconj. J.* **20**: 301-317
161. **Tettamanti, G., Morgan, I. G., Gombos, G., Vicendon, G., and Mandel, P.** (1972). Sub-synaptosomal location of brain particulate neuraminidase. *Brain Res.* **47**: 515-518
162. **Thompson, A. K., Haisman, D. and Singh, H.** (2006b). Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soya phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 6390-6397
163. **Thompson, A. K., Hindmarsh, J. P., Haisman, D., Rades, T. and Singh, H.** (2006a). Comparison of the structure and properties of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soy phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 3704-3711
164. **Ugarte, E., Ruiz, R., Gabiña, D., and Beltrán de Heredia, I.** (2001). Impact of high-yielding foreign breeds on the Spanish dairy sheep industry. *Lives. Prod. Sci.* **71**: 3-10
165. **Urashima, T., Saito, T., Nakamura, T., and Messer, M.** (2001). Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconj. J.* **18**: 357-371
166. **Urashima, T., Saito, T., Nishimura, J., and Ariga, H.** (1989). New galactosyllactose containing α -glycosidic linkage isolated from ovine (*Booroola dorset*) colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* **992**: 375-378
167. **Vanier, M.T., Holm, M., Ohman, R., and Svennerholm, L.** (1971). Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. *J. Neurochem.* **18**: 581-592

168. **Varki, A.** (1997). Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J.* **11**: 248-255
169. **Varki, A.** (1999). Sialic acids. En: *Essentials of Glycobiology.* (Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 115-129
170. **Vázquez, A. M., Alfonso, M., Lanne, B., Karlsson, K. A., Carr, A., Barroso, O., Fernández, L. E., Rengifo, E., Lanio, M. E. and 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
171. **Veh, R. W., Michalski, J. C., Corfield, A. P., Sander-Vewer, M., Gies, D., and Schauer, R.** (1981). New chromatographic system for the rapid analysis and preparation of colostrum sialyl oligosaccharides. *J. Chromatogr.* **212**: 313-322
172. **Vesper, H., Schmelz, E. M., Nilolova-Karakashian, M. N., Dillehay, D. L., Lynch, D. V. and Merrill, A. H.** (1999). Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nutr.* **129**: 1239-1250
173. **Walton, K. M., Sandberg, K., Rogers, T. B., and Schnaar, R.** (1988). Complex ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 2055-2063
174. **Wang, B., Brand-Miller, J., Mc Veagh, P., and Petocz, P.** (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**: 510-515
175. **Williams, A. P., Bishop, D. R., Cockburn, J. E., and Scott, K. J.** (1976). Composition of ewe's milk. *J. Dairy Res.* **43**: 325-329
176. **Zilliken, F., Braun, G. A., and Gyorgy, P.** (1955). Gynaminic acid. A naturally occurring from a neuraminic acid in human milk. *Arch. Biochem. Biophys.* **54**: 567-570
177. **Zittle, C. A., and Custer, J. H.** (1966). Identification of κ -casein among components of whole goat casein. *J. Dairy Sci.* **49**: 788-79