



Universidad de Costa Rica

Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de  
Licenciatura en Microbiología y Química Clínica

Componentes bioactivos de la leche materna y sus  
propiedades antiinfecciosas, inmunomoduladoras y  
antiinflamatorias

Katherine Zúñiga Herrera

Carné: A87164

Julio, 2023

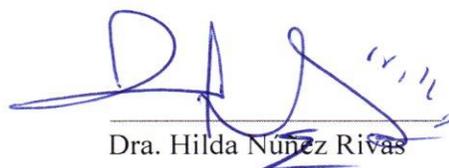
## APROBACIÓN

Los que aquí firmamos damos fe de este trabajo para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación.



Dra. Ileana Holst Schumacher

(Tutora)



Dra. Hilda Núñez Rivas

Lectora



Dr. Allan Vindas Valverde

Lector



Dr. José Arturo Molina Mora

Presidente Tribunal Evaluador



Dra. Rebeca Campos Sánchez

Miembro Tribunal Evaluador

## **Dedicatoria**

*Dedico este trabajo en primer lugar a Dios, quien me ha dado la fortaleza para avanzar y la sabiduría para alcanzar con éxito mis metas.*

*A mi esposo por su apoyo, amor y comprensión incondicional en todo este proceso, por ser mi soporte y mi paz, por la paciencia y su fe en mí.*

*A mi hija por ser el motor que impulsó el deseo de continuar y terminar mi carrera, por enseñarme a amar la lactancia materna en estos 4 años y por ser mi inspiración día a día.*

*A mi suegra Kattia quien fue clave para realizar este trabajo, por tanta ayuda, entrega y amor.*

*A mi madre por darme el apoyo y el amor para poder tener una carrera universitaria.*

*Por último, dedico este trabajo a mi mejor amigo Allan quien siempre me ha ayudado, por ser como un ángel en mi vida y por tantos maravillosos años de amistad.*

## **Agradecimiento**

*En primer lugar, quiero agradecer a la doctora Ileana Holst por abrirme las puertas y darme la oportunidad de terminar mi carrera, por sus palabras de aliento y su disposición siempre de ayudar. También quiero agradecer a la doctora Hilda por su colaboración y comprensión en todo momento. Por último y no menos importante a mis familiares Abi y Fran que me brindaron su ayuda para que este trabajo fuera posible.*

# Índice general

Abreviaturas .....	7
Justificación .....	10
Objetivos.....	13
Metodología.....	14
Resumen .....	15
Antecedentes.....	16
Capítulo 1: Mecanismos de acción generales que poseen los componentes bioactivos de la leche materna para protección y defensa contra patógenos .....	22
1.1 Receptor señuelo .....	22
1.2 Modulación celular.....	24
1.3 Inmunomodulación .....	26
Capítulo 2: Análisis de los principales componentes bioactivos de la leche materna y su efecto inmunomodulador, antiinflamatorio y antiinfeccioso .....	29
2.1 Carbohidratos .....	29
2.1.a Oligosacáridos (HMOs).....	29
2.1.b Glicosaminoglicanos (GAGs) .....	39
2.2 Proteínas .....	42
2.2.a Caseínas .....	43
2.2.b $\alpha$ -lactoalbúmina .....	45
2.2.c Lactoferrina.....	47
2.2.d Lisozima .....	52
2.2.e Inmunoglobulinas .....	52
2.2.f Osteopontina (OPN).....	63
2.2.g Membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM) y proteínas asociadas..	67

2.3 Lípidos del glóbulo de grasa de la leche .....	76
2.4 Otros componentes importantes en la leche materna .....	82
2.4.a Células .....	82
2.4.b Microbiota .....	83
2.4.c Citocinas y factores de crecimiento .....	86
Capítulo 3: Propiedades de los componentes bioactivos de la leche materna contra el SARS-CoV-2 y la COVID-19 .....	93
Discusión .....	110
Conclusiones.....	120
Referencias .....	123

## Abreviaturas

2'FL	2'fucosil lactosa
3'FL	3'fucosil lactosa
3'SL	3'sialil lactosa
6'SL	6'sialil lactosa
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
BTN	Butirofilina
Células NK	Células natural killer
CPA	Células presentadoras de antígeno
CS	Condroitín sulfato
DHA	Ácido docosahexaenoico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
FcRn	Receptor neonatal para el Fc
GAG's	Glicosaminoglicanos
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
GML	Monolaurato de glicerol
HBGAs	Histo-blood group antigens

HMOs	Human milk oligosaccharides
HS	Heparán sulfato
HSPGs	Proteoglicanos de heparán sulfato
HSV	Virus del herpes simple
IFN	Interferón
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LF	Lactoferrina
LNnT	Lacto-N-neotetraosa
LNT	Lacto-N-tetraosa
LPS	Lipopolisacárido
MC	Milk components
MFG	Milk fat globule
MFGM	Milk fat globule membrane
NEC	Necrotizing enterocolitis
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B

OPN	Osteopontina
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
pIgR	Receptor polimérico de inmunoglobulina
PPR	Pattern recognition receptor
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2
SIgA	Secretory immunoglobulin A
TAG	Triacilglicéridos
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento de transformación beta
Th1	Linfocitos T-cooperador 1
TLRs	Toll-like receptors
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VRS	Virus respiratorio sincitial
$\alpha$ -La	$\alpha$ -Lactoalbúmina

## Justificación

La lactancia materna influye positivamente en el crecimiento del bebé y al mismo tiempo brinda protección contra muchas enfermedades. Esta proporciona el equilibrio ideal de nutrientes para el lactante y contiene innumerables factores bioactivos que protegen al lactante en la vida temprana (Morrin et al., 2021).

El recién nacido se expone a una gran cantidad de microorganismos y proteínas extrañas, mientras que el sistema inmune del tracto gastrointestinal y de las mucosas en general es inmaduro. Al menos el 90% de los microorganismos patógenos que infectan a los seres humanos utilizan las mucosas como vía de entrada (Brandtzaeg, 2010; Morrin et al., 2021; Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016).

El período neonatal es particularmente crítico y vulnerable, durante el cual los recién nacidos a término y prematuros tienen un alto riesgo de morbilidad y mortalidad asociadas a enfermedades infecciosas como otitis media, gastroenteritis, infecciones del tracto respiratorio, sepsis y meningitis. Según datos de la OMS, en el 2016 murieron 2,6 millones de recién nacidos en todo el mundo, lo que representa el 46 % de las muertes de menores de cinco años. Las infecciones por patógenos son responsables de aproximadamente el 36 % de las muertes que ocurren en el período neonatal (Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016; Telang, 2018).

En los países en vías de desarrollo, los lactantes son muy susceptibles a enfermedades diarreicas frecuentes, lo que provoca 700 000 muertes anuales en niños menores de 5 años. En particular, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), rotavirus, *Shigella spp* y *Vibrio cholerae* representan altas tasas de mortalidad infantil en estos países. Sin embargo, los bebés que son alimentados exclusivamente con leche materna tienen una menor incidencia no sólo de infecciones gastrointestinales, sino también de infecciones del tracto respiratorio, otitis media, alergias atópicas, obesidad, diabetes entre otras enfermedades en comparación con los niños alimentados con fórmula láctea infantil (Atyeo & Alter, 2021; Cheng et al., 2021; Morrin et al., 2021).

Además, datos epidemiológicos sugieren que el riesgo de morir por diarrea podría reducirse hasta 20 veces en niños alimentados exclusivamente con leche materna. La lactancia materna es importante no sólo como terapia de “sustitución inmunológica” natural en la inmunidad deficiente del neonato, sino también por los componentes bioactivos que desempeñan múltiples funciones antiinfecciosas e inmunomoduladoras (Brandtzaeg, 2010).

Los beneficios de la leche materna no sólo son de tipo antiinfeccioso, sino también antiinflamatorio. Se ha observado que cuando los bebés son alimentados con leche materna existe una menor incidencia y gravedad de la enterocolitis necrotizante. Esta es una enfermedad devastadora que se caracteriza por inflamación intestinal exacerbada de causas desconocidas y que representa una alta mortalidad en bebés prematuros (Thai & Gregory, 2020).

Debido a todas estas razones y al reconocer la leche materna como un factor protector fundamental para la salud de los bebés, es de suma importancia analizar de manera exhaustiva la presencia y funcionalidad de los distintos componentes bioactivos que posee con el fin de transmitir una mejor educación sobre la lactancia materna (Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016).

Este conocimiento es clave para incentivar campañas de divulgación y apoyo a lactancia materna exclusiva en los primeros 6 meses de vida hasta los 2 años o más de edad. Estas campañas serían dirigidas a profesionales de la salud y sobre todo a aquellas madres que se encuentren en esta etapa de vital trascendencia en la vida de sus bebés. Además, este tipo de investigaciones permiten que la leche materna sea tomada como opción terapéutica en lactantes de alto riesgo como los bebés prematuros.

La prevención de enfermedades en los recién nacidos al fomentar la lactancia materna disminuiría los internamientos por complicaciones en los hospitales nacionales y con esto los costos económicos que conllevan.

Por ejemplo, en Costa Rica el Laboratorio de Virus Entéricos (parte de Inciensa) realizó un informe sobre la vigilancia epidemiológica basada en laboratorio de norovirus y rotavirus grupo A en menores de 5 años con enfermedad diarreica aguda. Este informe mostró que,

durante el año 2021, de 58 muestras procesadas provenientes de hospitales estatales de niños que requirieron atención médica o que fueron internados, así como otras muestras enviadas por Patología Forense del Organismo de Investigación Judicial, en el 39,7% de las muestras se detectó norovirus GII (analizadas por RT-PCR) y el 5,2% fueron positivas por rotavirus grupo A. Además, de las 58 muestras el 69% correspondió a niños menores de 2 años (Inciensa. Vigilancia epidemiológica basada en laboratorio de norovirus y rotavirus grupa A en niños menores de 5 años con enfermedad diarreica aguda. Costa Rica: Inciensa; 2021. [accesado 27-5-2023]. Disponible en: <http://inciensa.sa.cr>)

Por otra parte, en los últimos años se han desarrollado varias fórmulas infantiles con el propósito de lograr una mayor similitud con la leche materna. Sin embargo, aunque estas fórmulas son similares a la leche humana no existe un sustituto perfecto para esta. Por lo que otro aspecto importante sobre estudiar y comprender las funciones de los distintos componentes bioactivos de la leche materna que contribuyen al desarrollo sano del bebé, tiene que ver con la optimización de la composición de la fórmula láctea infantil. Esto para promover la adición o el enriquecimiento de una variedad de factores bioactivos de la leche materna destinados a prevenir o combatir diversas infecciones (Kim & Yi, 2020; Morrin et al., 2021).

Finalmente, el reconocimiento de los mecanismos únicos por los cuales la leche humana protege y mejora el desarrollo, no sólo puede contribuir al diseño futuro de fórmulas infantiles, sino también puede proporcionar modelos para nuevos enfoques preventivos y terapéuticos en medicina. Por ejemplo, se ha observado que la leche materna es capaz de realizar funciones sobre los eventos patogénicos reconocidos y descritos en la enfermedad COVID-19. Estos factores bioactivos de la leche materna son bien tolerados y prácticamente libres de efectos secundarios, por lo tanto, la leche materna se convierte en un tema de investigación para descubrir terapias incluso en esta enfermedad (Ballard & Morrow, 2013; Quitadamo et al., 2021).

# Objetivos

## Objetivo General

Realizar una revisión bibliográfica sobre los diferentes componentes bioactivos de la leche materna y sus propiedades antiinfecciosas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias en lactantes para conocer y divulgar este conocimiento.

## Objetivos específicos

1. Describir los mecanismos generales de tipo directo e indirecto que explican las múltiples funciones de los componentes bioactivos de la leche materna en el contexto de las respuestas antiinfecciosas para conocer la importancia que tiene este fluido biológico en los recién nacidos.
2. Analizar de manera individual y específica los principales elementos que constituyen la leche materna y sus mecanismos de protección y defensa contra patógenos, además de sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras para conocer los beneficios de este fluido biológico.
3. Evaluar el papel de los componentes bioactivos la leche materna contra el SARS-CoV-2 y la COVID-19 para la protección del lactante.

## Metodología

Se realizará un compendio de información reciente sobre los componentes bioactivos de la leche materna y sus propiedades antiinfecciosas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias en lactantes. Se utilizarán las siguientes palabras clave tanto en español como en inglés: bioactividad de los componentes de la leche (bioactivity of milk components), leche humana (human milk), inmunología de la leche materna (immunology of breast milk), lactancia materna (breastfeeding), propiedades antiinfecciosas de la leche materna (anti-infective properties of breast milk), oligosacáridos en leche humana (human milk oligosaccharides), lípidos en leche humana (human milk lipids), proteínas en leche humana (human milk proteins), glicosaminoglicanos en leche humana (human milk glycosaminoglycans), SARS-CoV-2 y leche humana (SARS-CoV-2 and human milk), leche materna y COVID-19 (breastfeeding and COVID-19).

La búsqueda de información se llevará a cabo en las bases de datos en línea de la Organización Mundial de la Salud (OMS), PubMed, Scielo, Sistema de Bibliotecas Documentación e información (SIBDI) y de revistas como *Frontiers in Nutrition*, *Nutrients*, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *Frontiers in Immunology*, *Frontiers in Pediatrics*, *Beneficial Microbes*, *Microbial Cell Factories*, *Journal Of Proteome*, *Journal Of Immunology research*, *Clinics*, *Genome Medicine*, *Biomedicines*, entre otras. Para la obtención de información y publicaciones relacionadas con esta revisión. La revisión bibliográfica se realizó a partir de literatura científica encontrada hasta febrero del 2023, excluyendo bibliografía muy antigua, excepto artículos científicos importantes clásicos.

Para realizar esta revisión bibliográfica no se utilizó información de páginas web o blogs que no estuvieran debidamente respaldados por una publicación científica en una revista indexada en las bases de datos a nivel nacional e internacional. Este fue el único criterio de exclusión utilizado en esta revisión.

## **Resumen**

En este trabajo se revisa la información actual sobre los beneficios de los principales componentes bioactivos presentes en la leche materna que contribuyen al desarrollo neonatal y la protección del lactante. Primero se explican de manera general los distintos mecanismos de tipo directo e indirecto por medio de los cuales estos factores bioactivos ejercen su función de protección al lactante, estos incluyen protección directa contra patógenos, modulación del sistema inmune y modulación celular del tracto gastrointestinal del bebé.

En segundo lugar, se analizan las propiedades antiinfecciosas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias de cada uno de los macronutrientes de la leche materna como carbohidratos, proteínas y lípidos; además de otros componentes como células, citocinas, factores de crecimiento y microbiota para el adecuado desarrollo intestinal, inmunológico y protección del lactante. Por último, se evalúa el posible papel de los componentes bioactivos de la leche materna en el contexto de la enfermedad COVID-19, analizando los efectos antivirales, antiinflamatorios e inmunorreguladores de algunos de estos componentes específicamente contra el SARS-CoV-2.

## Antecedentes

La leche materna es fundamental para el crecimiento y el desarrollo del bebé inmediatamente después del nacimiento y es una fuente insustituible de nutrición e inmunidad para la supervivencia humana en la vida temprana. Esta ofrece la nutrición completa para el recién nacido, así como el aporte de componentes bioactivos que contribuyen al desarrollo saludable del bebé. Se considera el estándar de oro para la nutrición infantil, por lo que la Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia recomiendan la alimentación exclusiva con leche materna durante al menos los primeros 6 meses después del nacimiento y continuar con la lactancia hasta los 2 años o más de edad (Ballard & Morrow, 2013; Cheng et al., 2021; Kim & Yi, 2020; Zheng et al., 2022).

La lactancia materna se asocia con considerables beneficios para la salud, entre ellos la protección contra diarreas, enterocolitis necrotizante, infecciones respiratorias, otitis media aguda, dermatitis atópica, obesidad, enfermedades alérgicas, entre otras (Zimmermann & Curtis, 2020).

La leche humana es una matriz compleja que contiene entre un 87% y 88% de agua, posee una gravedad específica de 1,030, una osmolaridad de 286 mOsm/L y contiene componentes sólidos como macronutrientes en una concentración aproximada de 124 g/L. Los carbohidratos corresponden a un 7% (60-70 g/L), las proteínas representan el 1% (8-10 g/L) y los lípidos representan el 3,8% (35-40 g/L). Por lo general, la leche madura contiene entre 65 a 70 kcal de energía por cada 100 ml y alrededor del 50% del suministro total de calorías proviene de las grasas y el 40% de los carbohidratos (Kim & Yi, 2020; Pérez-bermejo et al., 2021).

La composición de nutrientes y factores bioactivos de la leche materna es dinámica, lo que puede considerarse la respuesta de la madre a las necesidades cambiantes del bebé (crecimiento, enfermedad infecciosa, inflamación, entre otros). Además, esta puede variar según la dieta materna, la fisiología de la glándula mamaria, la etapa de lactancia en la que se encuentre, la salud materna y muchos otros factores ambientales. También puede variar si se trata de leche materna para un bebé prematuro, ya que estos son más propensos a sufrir enfermedades inflamatorias, por lo que la leche tiende a ser más alta en proteínas,

componentes bioactivos y grasas (Ballard & Morrow, 2013; Cheng et al., 2021; Kim & Yi, 2020; Zheng et al., 2022).

La leche materna se puede clasificar en diferentes tipos según el tiempo de lactancia transcurrido desde el parto y las necesidades de crecimiento del recién nacido. Se clasifica en calostro que se produce desde el parto hasta el día 7; leche de transición que se produce entre el séptimo día y quince días después del parto; y la leche madura que comienza 4 semanas después del parto (Lokossou et al., 2022).

El calostro es el primer fluido producido por las madres después del parto y es distinto en volumen, apariencia y composición en comparación con la leche madura. Se produce en bajas cantidades en los primeros días postparto. El contenido de grasa y carbohidratos es relativamente bajo, pero es alto en proteínas. Además, es rico en componentes inmunoprotectores como la SIgA, lactoferrina, lisosima, leucocitos y factores de crecimiento. Esto sugiere que su función principal es inmunológica más que nutricional, ofreciendo protección inmediata al recién nacido contra infecciones por patógenos, ya que el primer mes después del nacimiento es el período de mayor susceptibilidad a las infecciones (Ballard & Morrow, 2013; Kim & Yi, 2020; Zheng et al., 2022).

La leche de transición tiene características mixtas de calostro y leche madura, esta representa un período de aumento en la producción de leche para satisfacer las necesidades nutricionales y de desarrollo del bebé que se encuentra en una etapa de crecimiento rápido (Ballard & Morrow, 2013; Zheng et al., 2022).

A diferencia del calostro, la leche madura tiene una concentración más baja de proteínas y componentes inmunológicos, pero una mayor concentración de carbohidratos y grasas, lo que refuerza su función nutricional (Ballard & Morrow, 2013; Zheng et al., 2022).

Se ha reconocido en la última década que la leche materna es más que una fuente de nutrientes, también es una fuente de componentes bioactivos que impactan el metabolismo y el sistema inmune del lactante. Los componentes bioactivos de un alimento son elementos que afectan los procesos o sustratos biológicos, por lo que tienen un impacto en la función o

condición corporal, que se verá reflejado en la salud del individuo (Ballard & Morrow, 2013; Cheng et al., 2021).

Estos componentes bioactivos esenciales algunas son producidos y secretados por el epitelio mamario (ejemplo,  $\alpha$ -lactoalbúmina), otros son producidos por células presentes en la leche materna (ejemplo, células inmunes productoras de citocinas), mientras que otros se extraen del suero materno y se transportan a través del epitelio mamario mediante transporte mediado por receptores (ejemplo, inmunoglobulinas) (Ballard & Morrow, 2013; Cheng et al., 2021).

Además, existe la secreción del glóbulo de grasa de la leche (MFG, por sus siglas en inglés) por parte del epitelio mamario. La leche materna se caracteriza por ser una emulsión de glóbulos de grasa láctea en un líquido acuoso. Estos glóbulos de grasa de la leche se forman en las células alveolares mamarias. Contienen un núcleo de lípidos compuesto principalmente por triacilglicéridos con pequeñas cantidades de monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos no esterificados. Estos MFG se forman en el retículo endoplasmático a partir de ácidos grasos obtenidos de la circulación materna y están rodeados por una monocapa de fosfolípidos (Koletzko, 2016).

Cuando esos MFG se excretan hacia el espacio alveolar, quedan cubiertos por una porción de la membrana de la célula epitelial mamaria, lo que da como resultado la adición de otra bicapa de fosfolípidos y otros componentes de la membrana como proteínas y glicoproteínas. Esta capa externa es la membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM, por sus siglas en inglés) (Koletzko, 2016).

Los componentes bioactivos de la leche materna incluyen un gran grupo de compuestos entre ellos carbohidratos (oligosacáridos y glicosaminoglicanos), proteínas que se dividen en caseínas, proteínas del suero (lactoferrina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, inmunoglobulinas, lisozima, osteopontina) y proteínas ligadas a la membrana del glóbulo de grasa de la leche (mucinas, lactoadherina, xantina oxidoreductasa, entre otras). Incluyen también lípidos aportados por el glóbulo de grasa de la leche y otros componentes importantes como las células (entre ellas los leucocitos), citocinas, factores de crecimiento, bacterias beneficiosas, entre otros mediadores activos (Cheng et al., 2021; Zheng et al., 2022; Zimmermann & Curtis, 2020).

Cada vez hay más evidencia de que los componentes bioactivos de la leche materna poseen beneficios a corto y largo plazo en el sistema intestinal en desarrollo del recién nacido. Estos ejercen varias funciones, entre ellas: actividad antimicrobiana, desarrollo y modulación de las respuestas inmunológicas e inflamatorias, actividad antioxidante, estimulación del crecimiento y maduración intestinal. Además, mejoran la absorción de micronutrientes y su disponibilidad e intervienen en la modulación y composición de la microbiota intestinal del lactante que a su vez participa en la homeostasis intestinal y la regulación del sistema inmune (Cheng et al., 2021; Zheng et al., 2022; Zimmermann & Curtis, 2020).

Un aspecto importante de destacar es que los componentes de la leche materna además de las funciones mencionadas anteriormente poseen un rol fundamental en el desarrollo neurológico del bebé. Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados ampliamente investigados por su papel en el desarrollo cerebral (Brink & Lönnerdal, 2020). Además, los lípidos forman la estructura del sistema nervioso central y desempeñan funciones importantes como estimular el desarrollo, migración y diferenciación de las células nerviosas. Forman parte de la materia gris, la materia blanca, los núcleos nerviosos y la sinaptogénesis (HF & S, 2016).

El tracto gastrointestinal inmaduro del bebé es el primer órgano que está en contacto con las moléculas bioactivas de la leche materna, por lo que entender la estructura y función del sistema inmune de la mucosa es importante (Cheng et al., 2021).

El tracto gastrointestinal es el órgano más grande inmunológicamente activo en el ser humano, la mucosa de un adulto sano contiene más del 80% de las células inmunológicas del cuerpo. Su función principal además de la absorción de nutrientes es proteger al hospedador de microorganismos patógenos de la luz intestinal y al mismo tiempo inducir tolerancia a la microbiota saludable. Esta microbiota es necesaria para los procesos digestivos, además genera productos de fermentación beneficiosos como los ácidos grasos de cadena corta necesarios para la homeostasis intestinal (Brandtzaeg, 2010; Cheng et al., 2021).

El sistema de defensa de la mucosa posee una barrera física que está compuesta de moco y células epiteliales que se encuentran estrechamente conectadas para impedir el paso del contenido luminal duro del intestino. En el intestino delgado el sistema inmune de la mucosa

se encuentra muy organizado (Allaire et al., 2018; Cheng et al., 2021; Knoop & Newberry, 2018).

En primer lugar, se encuentran unas proyecciones en forma de “dedos” llamadas vellosidades cuya función principal es la absorción de nutrientes. Alrededor de las vellosidades, en las criptas del intestino delgado, se localizan las células madre intestinales y las células de Paneth que producen péptidos antimicrobianos y se encargan de mantener un equilibrio saludable en la microbiota intestinal. Las células caliciformes se encuentran distribuidas entre las células epiteliales y se encargan de secretar moco, que es la principal barrera entre la luz del intestino y las células epiteliales (Allaire et al., 2018; Cheng et al., 2021; Knoop & Newberry, 2018).

Los componentes inmunes del tejido linfoide asociado al intestino (GALT por sus siglas en inglés) se encuentran en las placas de Peyer, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en la lámina propia. El GALT es un órgano linfoide secundario que se puede dividir en sitios de inducción de inmunidad (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) y sitios efectores que se distribuyen por toda la región de la lámina propia intestinal donde se alojan los linfocitos T y B activados (Brandtzaeg, 2010; Cheng et al., 2021).

Las placas de Peyer son tejidos linfoides más organizados y estables que se encuentran justo debajo del epitelio intestinal a lo largo de algunas partes del intestino delgado. Contienen células inmunes y están cubiertas por células epiteliales especializadas llamadas células M que se encargan de transferir antígenos desde la luz del intestino. La función principal de las placas de Peyer es la presentación de antígenos que se da por la transcitosis del antígeno luminal a través del epitelio llevado a cabo por las células M, o por células dendríticas que directamente sacan proyecciones o dendritas hacia la luz intestinal y así regular y coordinar las respuestas inmunológicas (Brandtzaeg, 2010; Cheng et al., 2021).

Las placas de Peyer contienen folículos donde se encuentran las células B, estas secretan IgA que une y neutraliza patógenos y antígenos de origen alimentario no deseados. Las células presentadoras de antígenos presentes en las placas de Peyer como las células dendríticas pueden migrar a los ganglios linfáticos mesentéricos después de la captación de antígenos y activar los linfocitos T vírgenes. Algunas de estas poblaciones son células T reguladoras, que inducen tolerancia a los antígenos alimentarios y la microbiota; mientras que los linfocitos T

colaboradores (CD4) se inducen por otros antígenos no deseados como los patógenos (Brandtzaeg, 2010; Cheng et al., 2021).

El intestino grueso se considera un sitio inmunológicamente menos activo en comparación con el intestino delgado. Sin embargo, la microbiota que se encuentra en el colon produce grandes cantidades de productos de fermentación, como vitaminas, ácidos grasos de cadena corta y ácidos biliares secundarios, que modulan el metabolismo del hospedador y son esenciales para la salud humana, por ejemplo el butirato relacionado con la generación de células T reguladoras que inducen tolerancia a los antígenos alimentarios en los bebés (Cheng et al., 2021).

En las etapas tempranas de la vida, el sistema inmune del intestino es inmaduro y se va desarrollando en el período postnatal temprano bajo la influencia de los componentes bioactivos de la leche materna, al encontrar nuevos componentes dietéticos y al exponerse a diversidad de microorganismos. Los factores bioactivos de la leche materna facilitan y aceleran la maduración de las células inmunes e intestinales mejorando la barrera intestinal y apoyando la regulación de las respuestas de defensa contra microorganismos no deseados. Además, apoyan la colonización de más de 100 billones de bacterias en el intestino delgado y grueso que ayudan a la digestión de los alimentos y a la producción de productos de fermentación necesarios para apoyar el metabolismo y la inmunidad en los bebés (Cheng et al., 2021).

## **Capítulo 1: Mecanismos de acción generales que poseen los componentes bioactivos de la leche materna para protección y defensa contra patógenos**

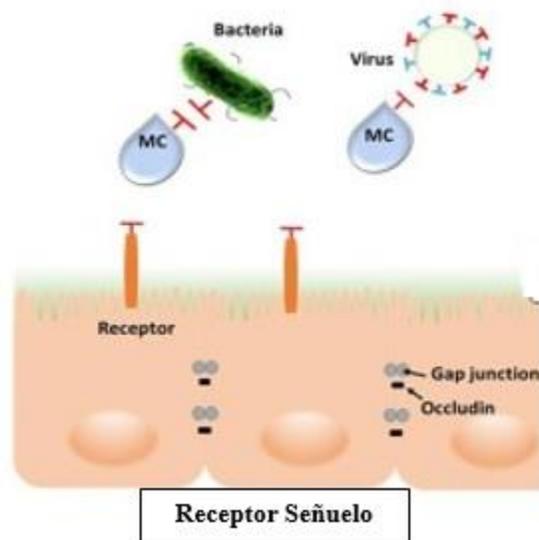
Los componentes bioactivos de la leche materna ejercen su función a través de distintos mecanismos de tipo directo e indirecto, lo que da como resultado un bloqueo en la adhesión e internalización de los agentes infecciosos. La importancia de estos mecanismos radica en que para poder colonizar y multiplicarse los patógenos deben adherirse a la superficie de las células epiteliales, específicamente a receptores celulares (Morrin et al., 2021).

A continuación, se describen de manera general los 3 mecanismos protectores más importantes reportados en la literatura científica de los componentes de la leche materna y su función en la protección del hospedador contra infecciones.

### **1.1 Receptor señuelo**

Algunos componentes de la leche materna poseen características estructurales idénticas a las que se encuentran en la superficie de las células epiteliales blanco de agentes infecciosos, ya que se producen mediante vías enzimáticas similares, esto resulta en el bloqueo directo de la adhesión del patógeno al interactuar con el componente de la leche en lugar de la superficie celular, a este mecanismo se le conoce como receptor señuelo (Morrin et al., 2021).

El componente de la leche materna en suspensión se une al microorganismo neutralizándolo e impidiendo su unión a receptores específicos en la superficie de la célula, de esta manera es eliminado cuando se opsoniza y se provoca su fagocitosis por células inmunes o a través de la perturbación de la membrana celular del patógeno (figura 1). Además, estos componentes también pueden modificar las características físicoquímicas de los patógenos, esto lleva a una motilidad y virulencia menor lo que afecta su interacción específica con las células epiteliales a las cuales se dirigen (Morrin et al., 2021).



**Figura 1.** Receptor señuelo: Los componentes de la leche materna (MC por milk components) se asemejan a estructuras a las que se dirigen patógenos específicos por lo que se unen por error a estos sin poder llevar a cabo la unión a la célula blanco (Modificada de Morrin et al., 2021).

Los enteropatógenos causantes de infecciones gastrointestinales necesitan adherirse a los enterocitos para poder colonizar el tubo digestivo, invadir el epitelio y pasar eventualmente a sangre, esto lo hacen por medio de lectinas que se unen a los azúcares complejos en el borde en cepillo de los enterocitos. Este proceso debe llevarse a cabo para poder proliferar, colonizar el tubo digestivo y manifestarse cualquier síntoma de enfermedad (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b).

Los oligosacáridos (HMOs, por human milk oligosaccharides) que aporta la leche materna y que se encuentran libres en el lumen intestinal ejemplifican el mecanismo de receptor señuelo, ya que tienen estructuras moleculares similares a los receptores de membrana del borde en cepillo, por lo que funcionan como señuelos que se unen a las lectinas del enteropatógeno y bloquean su adherencia a los enterocitos, lo que previene la infección y episodios de diarrea (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b).

La efectividad de este mecanismo se puede ver ejemplificado con microorganismos como *Campylobacter jejuni*, que es una de las causas más comunes de diarrea bacteriana y mortalidad infantil (Cheng et al., 2021). Un estudio realizado *in vitro* en cultivo de células intestinales de cerdos recién nacidos demostró que los oligosacáridos fucosilados de la leche

materna resultaron ser altamente efectivos para bloquear la adherencia de esta bacteria (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b).

Un aspecto que influye en la susceptibilidad a la infección es la capacidad que poseen ciertas bacterias para unirse selectivamente a la mucosa intestinal por medio del reconocimiento de azúcares específicos. Los componentes de la leche como glicoproteínas (MUC1, MUC4) y gangliósidos que conforman la membrana del glóbulo de grasa de la leche, tienen la capacidad de interferir con el reconocimiento de patógenos pues actúan como señuelos e impiden la unión a la mucosa intestinal, haciendo que los microorganismos interactúen con estos componentes antimicrobianos y no con su blanco celular (Lee, Padhi et al., 2018; Thum et al., 2022).

## **1.2 Modulación celular**

La función primaria del tracto gastrointestinal es digerir y absorber nutrientes, a la vez actúa como una barrera que protege al organismo contra agentes tóxicos o patógenos (Figueroa-Lozano & de Vos, 2019). Sin embargo, en bebés es funcionalmente inmaduro al nacer (Lewis et al., 2017).

La superficie celular puede ser protegida de diferentes maneras por componentes de la leche materna, ya que estos pueden mejorar la integridad de la barrera de las uniones intercelulares estrechas que controlan la permeabilidad de las células epiteliales ante el encuentro de patógenos, de esta manera los factores bioactivos no estarían bloqueando directamente la unión del microorganismo, sino reforzando las uniones intercelulares para impedir la colonización (Cheng et al., 2021; Morrin et al., 2021).

La permeabilidad intestinal aumentada juega un papel importante en las infecciones gastrointestinales, por lo que la prevención reduce la gravedad de la enfermedad o incluso puede evitarla (Morrin et al., 2021).

Los factores bioactivos de la leche materna pueden modular la expresión génica de las células epiteliales del hospedador e inducir la producción de azúcares y/o proteínas específicas en la superficie celular, lo que afecta indirectamente la disponibilidad de los ligandos requeridos por patógenos para su unión inicial (Morrin et al., 2021).

Los oligosacáridos presentes en la leche materna pueden funcionar como moduladores de las células epiteliales del intestino y tener influencia directa sobre ellas, ya que pueden inhibir su proliferación en condiciones de homeostasis o podrían aumentar la multiplicación de las células de las criptas intestinales en condiciones inflamatorias para proteger contra enterocolitis necrotizante (Kuntz et al., 2008; Wang et al., 2019).

Los HMOs también pueden alterar la estructura de la capa de glicocálix (material extracelular compuesto por proteínas y azúcares presente en el moco intestinal) producido por el epitelio intestinal, este es requerido por diferentes virus y bacterias para adherirse y poder colonizar e invadir al hospedador (Angeloni et al., 2005; Kong et al., 2019). Se ha observado en estudios *in vitro* que el 3'SL reduce la expresión génica de las sialiltransferasas ST3Gal1, ST3Gal2 y ST3Gal4, lo que resulta en la reducción de la sililación en los enlaces  $\alpha$ 2-3 y  $\alpha$ 2-6 de los azúcares de la superficie celular en células Caco2; como resultado se disminuye la adherencia de EPEC en un 50% (Angeloni et al., 2005). Se ha observado también que el 2'FL y el 3'FL incrementan de manera significativa el grosor de la capa de glicocálix (Kong et al., 2019).

Se ha demostrado que una mezcla de HMOs aislados de leche puede incrementar la expresión de mucina (protege la integridad de la mucosa) en células intestinales *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En este estudio se le administró una mezcla de oligosacáridos por sonda oral a crías de ratón, lo que aumentó los niveles de proteína MUC2 y disminuyó la permeabilidad del intestino al dextrano macromolecular. Además, se evidenció que los HMOs de la leche humana pueden inducir la expresión del gen MUC2 y disminuir la permeabilidad del dextrano durante un desafío enterohemorrágico causado por *Escherichia coli* O157:H7 en las células epiteliales del intestino (Wu et al., 2019).

Otro componente de la leche materna que provee protección al lactante por medio de la modulación de las células intestinales son los lípidos. Estos mejoran la integridad intestinal sirviendo como componentes esenciales para la estructura de la membrana celular, a la vez funcionan como mensajeros de señalización para el crecimiento, proliferación y migración celular (Lee, Padhi et al., 2018). Se observó en un estudio realizado con crías de rata, que la adición de la MFGM de origen bovino a una fórmula control, aceleró el desarrollo intestinal y mejoró la arquitectura de la mucosa intestinal al mejorar la proliferación y diferenciación

de células epiteliales, así como la expresión de proteínas de unión estrecha (Bhinder et al., 2017).

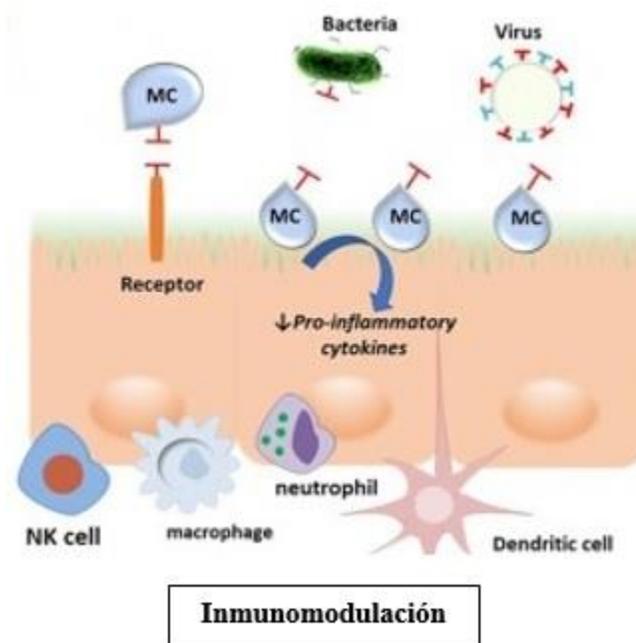
Otro estudio evidenció que cuando se alimentan ratones con una dieta rica en MFGM después del destete, se fortalece la barrera mucosa ya que los protege contra el daño intestinal inducido por LPS (Snow et al., 2011). Por otra parte, se observó en un modelo de células Caco-2 que la adición de lípidos polares derivados de la leche bovina en forma de concentrado de suero beta, disminuyó el daño de la barrera epitelial intestinal causado por TNF- $\alpha$  (Anderson et al., 2018).

La MFGM presente en la leche, posee lípidos polares cuyos productos digestivos son esenciales para el desarrollo morfológico y funcional del intestino del recién nacido, además es un transportador exclusivo de gangliósidos, estos pueden incorporarse a la mucosa intestinal y alterar la fluidez de la membrana y la función de los enterocitos (Lee, Padhi et al., 2018).

### **1.3 Inmunomodulación**

En etapas tempranas de la vida el sistema inmune intestinal es inmaduro y se desarrolla en el periodo postnatal bajo la influencia de factores bioactivos presentes en la leche materna como factores de crecimiento, carbohidratos, células y citocinas que aceleran el proceso de maduración inmunológica interactuando de manera directa. Además, estos factores regulan la diversidad de la microbiota que a su vez también tiene un impacto en el desarrollo inmune (Cheng et al., 2021).

La leche materna es una mezcla de moléculas capaces de modular el inicio y la evolución de los procesos de inmunidad (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b). Los componentes de la leche materna pueden ejercer funciones inmunomoduladoras atenuando la reacción inflamatoria producida por patógenos, de esta manera disminuir la gravedad de las lesiones y muerte celular (Morrin et al., 2021). Además, estos factores también pueden inducir fagocitosis de partículas bacterianas o virales activando células fagocíticas como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (figura 2).



**Figura 2.** Inmunomodulación: Los MC modulan las respuestas inmunológicas, como la atenuación de respuestas proinflamatorias exacerbadas causadas por una infección, además activan respuestas de fagocitosis (Modificada de Morrín et al., 2021).

Los HMOs presentes en la leche materna ayudan a regular las respuestas de la mucosa del tubo digestivo, evitando una reacción exacerbada que podría ser dañina. Tienen la capacidad de modular el funcionamiento del sistema inmune y la producción de citocinas, lectinas y receptores tipo toll (TLRs, por sus siglas en inglés) que regulan los procesos inflamatorios (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b).

Las bacterias Gram negativas causantes de episodios de diarrea activan procesos inflamatorios y secretorios intestinales a través de la liberación de lipopolisacárido (LPS), este se une a un receptor específico localizado en la superficie de los enterocitos formado por LBP (proteína que une LPS), TLR4, CD14 y antígeno linfocitario (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b).

Los HMOs en general y el 2'FL, disminuyen las señales que activan el proceso inflamatorio ya que bloquean la LBP, la liberación IL-8 (inducida por PAMPs) y CD14 que participa en el reconocimiento de LPS y está involucrado en la cascada de reacciones que desatan los episodios de diarrea. Además, el 2'FL estimula en la membrana plasmática de los enterocitos la producción de citocinas supresoras de señales, la fosforilación de sus transductores y del activador de señales tipo 3. También se ha observado con la presencia de HMOs del calostro

humano un aumento de citocinas como MIP-1- $\delta$  (CCL15) involucrada en la reparación celular y en la homeostasis de la mucosa intestinal inmadura en humanos (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b; He et al., 2016).

El papel de las moléculas de la leche en el fortalecimiento de la inmunidad innata se puede ver en estudios como el realizado en ratones con *Escherichia coli* enteroadherente e invasora (AIEC) productora de diarrea, en donde se pudo observar que el 2'FL disminuyó el daño metabólico de la infección, evitó la pérdida de peso y el acortamiento del colon. Además, la administración de este factor de la leche disminuyó la expresión del ARNm para CD14 en las criptas intestinales y se encontró menos cantidad de AIEC (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b).

Los lípidos presentes en la leche materna son componentes que también tienen participación en la modulación del sistema inmune. Los ácidos grasos poliinsaturados participan en la regulación de las respuestas inmunológicas e inflamatorias al inhibir la inducción de genes inflamatorios cuando se unen al receptor nuclear PPAR (receptor activado por proliferadores peroxisomales) (Quitadamo et al., 2021).

Los PUFA omega-3 disminuyen la actividad del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que induce genes proinflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), E-selectina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , óxido nítrico sintasa inducible y proteínas de fase aguda. Además, los PUFA en la leche humana pueden modular las respuestas inmunológicas, afectando el equilibrio entre las células Th1 y Th2 y las células T reguladoras y T auxiliares de la respuesta inmune adquirida (Quitadamo et al., 2021).

Estos mecanismos de acción para la protección y defensa del lactante contra patógenos serán analizados con mayor detalle para cada componente de la leche materna que se considere de mayor importancia en el siguiente capítulo.

## Capítulo 2: Análisis de los principales componentes bioactivos de la leche materna y su efecto inmunomodulador, antiinflamatorio y antiinfeccioso

### 2.1 Carbohidratos

#### 2.1.a Oligosacáridos (HMOs)

##### Estructura y composición

Uno de los componentes bioactivos de la leche materna más importantes son los oligosacáridos. La concentración de estos puede variar de 20 a 25 g/L en calostro hasta 5 a 20 g/L en leche madura (Cheng et al., 2021).

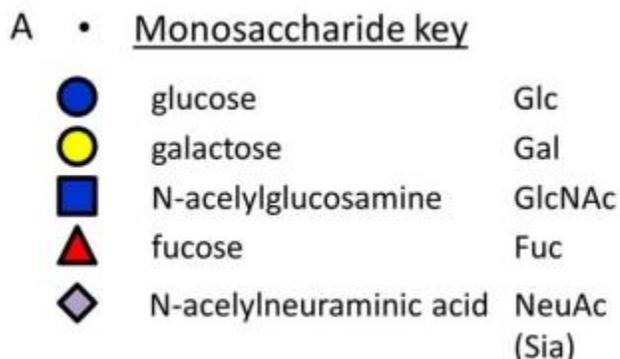
Se han descubierto y caracterizado alrededor de 200 moléculas diferentes de HMOs. Estas son sintetizadas y secretadas por la glándula mamaria a partir de lactosa (Tabla 1) (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a).

**Tabla 1.** Principales HMOs en la leche materna (Tomado de Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a).

<b>Categorías de HMOs (% del total)</b>	<b>Oligosacáridos</b>
Fucosilados (35-50%)	2'fucosil lactosa (2'FL) 3'fucosil lactosa (3'FL) Lacto-N-fucopentaosa I (LNFP I) Lacto-N-fucopentaosa II (LNFP II)
Sialilados (12-14%)	3'sialil lactosa (3'SL) 6'sialil lactosa (6'SL)
No fucosilados, neutrales (42-55%)	Lacto-N-neotetraosa (LNnT)

Los HMOs tienen como núcleo la lactosa (forma el polo reductor), a la cual se unen monosacáridos para dar origen a los diferentes HMOs con gran variedad de estructuras

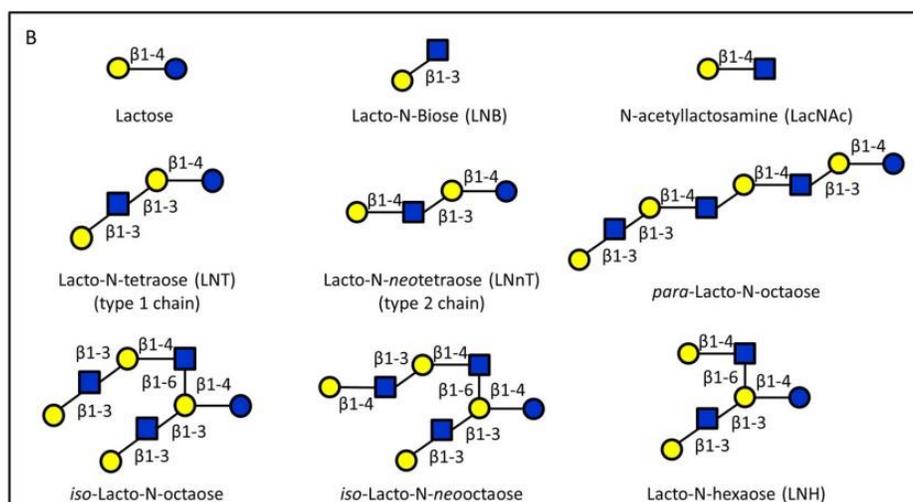
químicas. Los 5 monosacáridos son: glucosa (Glc), galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc; 6 desoxi-L-galactosa) y ácido siálico (NeuAc) (Figura 3) (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021).



**Figura 3.** Estructuras de los HMOs (Tomado de Cheng et al., 2021).

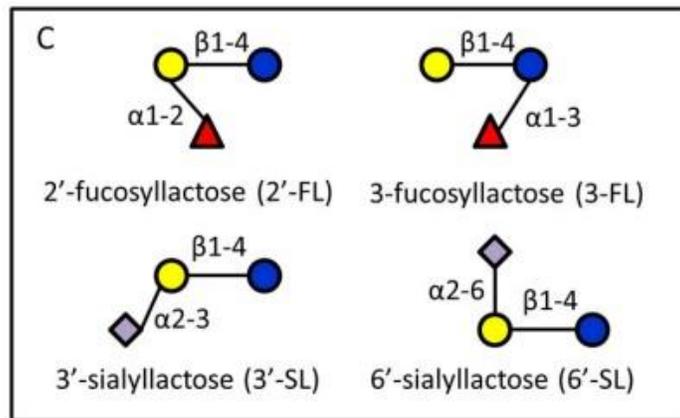
Todos los oligosacáridos se sintetizan a partir de la lactosa (Gal  $\beta$ 1-4Glc), que puede ser extendida por la adición de enlaces  $\beta$ 1-3 o  $\beta$ 1-6. Las elongaciones de las cadenas de sacáridos a través de uniones  $\beta$ 1-3 o  $\beta$ 1-6 con lacto-N-biosa (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc-, LNB) se denominan cadenas tipo 1, mientras que las elongaciones por enlaces con N-acetil-lactosamina (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-, LacNAc) forman cadenas tipo 2 (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021).

Las uniones  $\beta$ 1-3 entre monosacáridos producen compuestos de tipo lineal llamadas *para*-HMO, mientras que los enlaces  $\beta$ 1-6 crean estructuras ramificadas que son designadas como *iso*-HMO (Figura 4) (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021).



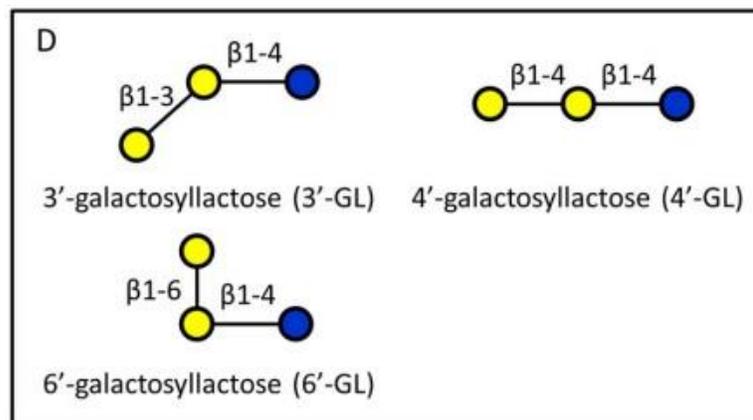
**Figura 4.** La lactosa puede ser elongada por la adición de lacto-N-biosa (tipo 1) o N-acetil-lactosamina (tipo 2). La adición de enlaces  $\beta$ 1-6 producen estructuras ramificadas (*iso*-HMO); los enlaces  $\beta$ 1-3 crean estructuras lineales (*para*-HMO). (Tomado de Cheng et al., 2021).

El esqueleto de los oligosacáridos puede estar sialilado o fucosilado y en el caso de los HMOs de cadena corta, pueden formar trisacáridos como el 2'FL, 3'FL, 3'SL y 6'SL. La lactosa que se une a la fucosa a nivel de su galactosa a través del enlace  $\alpha$ 1-2 forma la molécula 2'FL; si la unión se da por un enlace  $\alpha$ 1-3 a nivel de la glucosa se produce 3'FL. Además, la lactosa puede unirse con el ácido siálico mediante enlaces  $\alpha$ 2-3 y formar 3'SL o enlaces  $\alpha$ 2-6 lo que resulta en la formación de 6'SL (Figura 5) (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021).



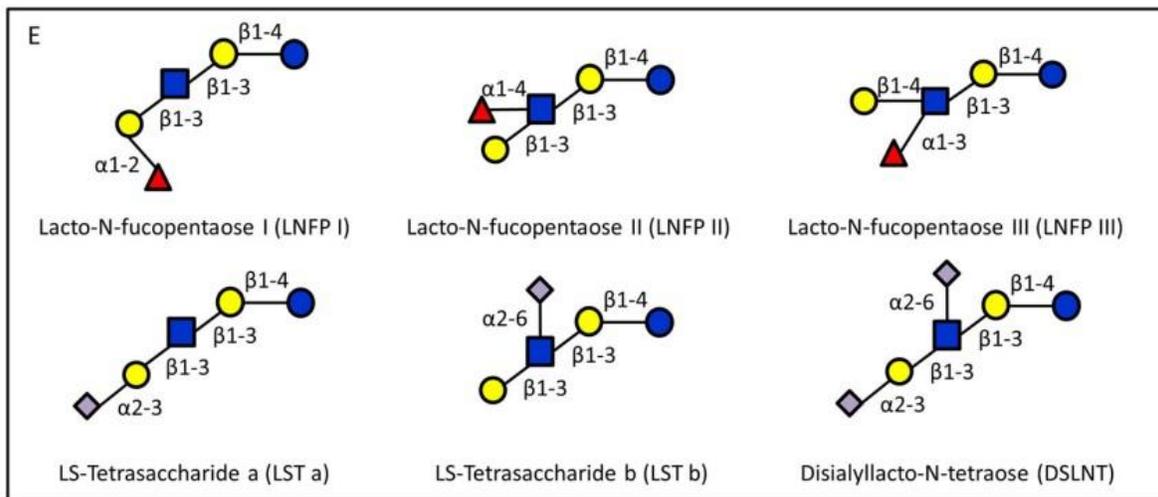
**Figura 5.** La lactosa es fucosilada o sialilada a través de diferentes enlaces para generar trisacáridos (Tomado de Cheng et al., 2021).

El núcleo de la lactosa también puede ampliarse con residuos de galactosil por enlaces  $\beta$ 1-3,  $\beta$ 1-4 y  $\beta$ 1-6 y formar galactosil lactosa (GL), que se encuentra en mayor proporción en el calostro (Figura 6) (Cheng et al., 2021).



**Figura 6.** Residuos de galactosil se unen a la lactosa a través de enlaces  $\beta$ 1-3,  $\beta$ 1-4 y  $\beta$ 1-6 para formar galactosil lactosas. (Tomado de Cheng et al., 2021).

Los HMOs elongados pueden ser sialilados en su parte terminal a través de enlaces  $\alpha$ 2-3 y/o  $\alpha$ 2-6 y formar una variedad de isómeros estructurales. También pueden ser fucosilados en las posiciones  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3 y/o  $\alpha$ 1-4 mediante fucosiltransferasas que se codifican de acuerdo con la genética de la madre, con nivel de actividad variable (Figura 7) (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021).



**Figura 7.** Cadenas tipo I o II elongadas pueden ser fucosiladas o sialiladas en diferentes enlaces para formar una variedad de isómeros estructurales (Tomado de Cheng et al., 2021).

En los HMOs, el carboxilo del ácido siálico produce una carga negativa (ácida) y su incorporación a la cadena depende de sialil-transferasas. Esto permite clasificar los HMOs en 3 categorías (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a):

- 1- Oligosacáridos neutros fucosilados
- 2- Oligosacáridos neutros, no fucosilados pero con N-acetilglucosamina
- 3- Oligosacáridos ácidos por la presencia de ácido siálico

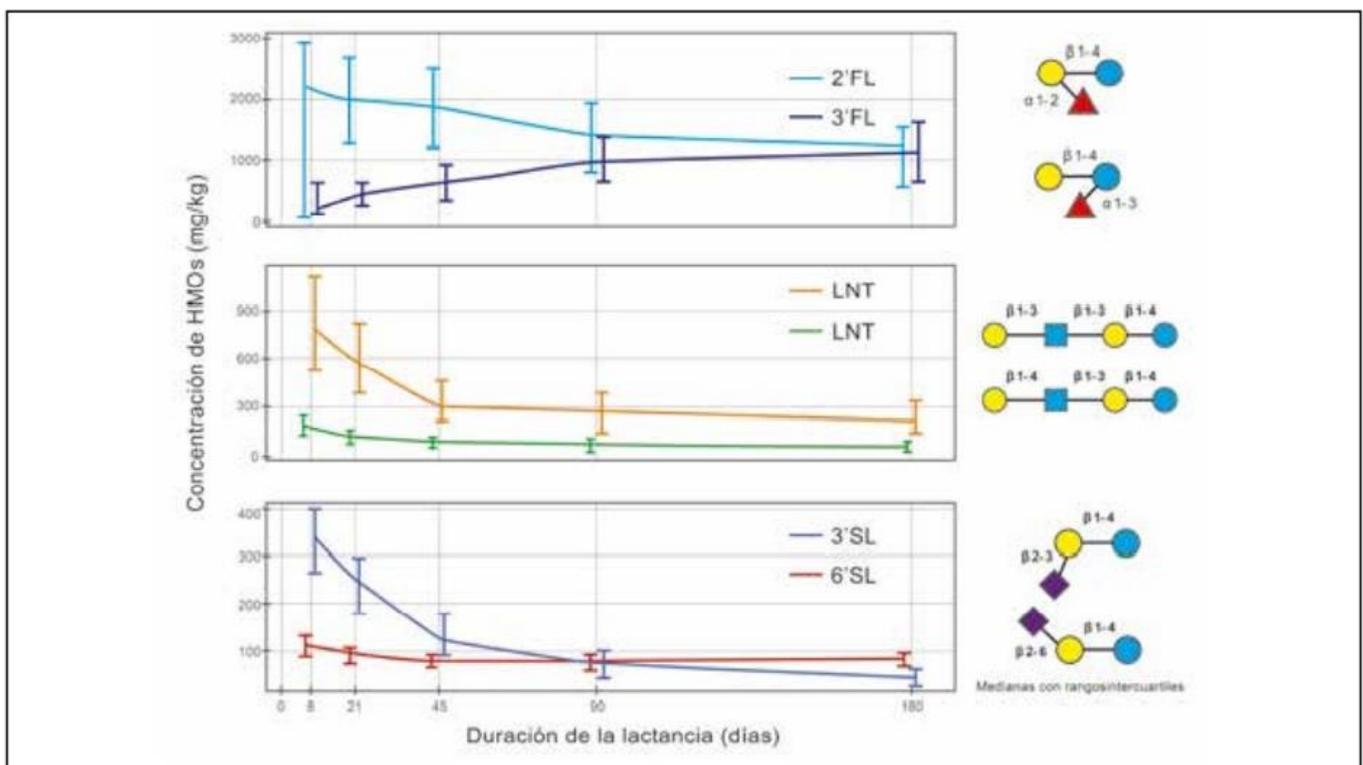
Se pueden generar miles de compuestos diferentes ya que en la estructura de estas moléculas pueden participar los cinco monosacáridos. Cada par de monosacáridos puede estar unido de manera teórica con orientaciones espaciales alfa o beta (cis o trans) por 13 enlaces químicos diferentes. Además, pueden darse orientaciones espaciales distintas de los enlaces entre los

átomos de carbono que forman los anillos de cada monosacárido (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a).

De esta manera las moléculas de la leche materna mediante un proceso de selección pueden adaptarse a cambios de la microbiota intestinal y a los requerimientos metabólicos de cada lactante. Cada madre puede sintetizar unas 65 moléculas diferentes (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a).

El perfil de los oligosacáridos cambia a lo largo de la lactancia, ya que se puede ver una disminución en la concentración de estos en la leche madura comparada con el calostro. Además, esta disminución no es uniforme; por ejemplo, la 2'FL disminuye a la mitad entre los 8 y 180 días de lactancia, sin embargo, en el mismo periodo se ve un aumento de 3'FL (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a).

Las concentraciones de cada compuesto se regulan en la glándula mamaria y se rigen por las necesidades de la glándula o del lactante. Además, las concentraciones de los HMOs pueden disminuir en velocidades diferentes (Figura 8) (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a).



**Figura 8.** Concentraciones de HMOs seleccionados y sus cambios en la leche materna durante la lactancia (Tomado de Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a).

La genética materna participa en la síntesis de HMOs, por lo que la madre transmite productos de su patrimonio genético a su descendencia a través de la leche (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a). Las estructuras y proporciones moleculares varían entre individuos y depende de la expresión en lactocitos de  $\alpha$ 1-2 fucosiltransferasa (FUT 2) y  $\alpha$ 1-3/4 fucosiltransferasa (FUT3) (Cheng et al., 2021).

La presencia de oligosacáridos fucosilados depende de la actividad de la FUT2, esta enzima cataliza la unión de unidades Fuc a los oligosacáridos neutros y a epítomos de los grupos sanguíneos ABO(H) mediante enlaces  $\alpha$ 1-2, esto permite el paso de HMOs 2'fucosilados a la leche materna (Cheng et al., 2021).

La enzima FUT2 está activa en 75-85% de las madres y es codificada por el gen *Se*, por lo que las madres con este locus activo se les denomina secretoras. La frecuencia de este carácter en la población se relaciona con el grupo étnico al que pertenecen. Además, la leche de estas mujeres contiene altas concentraciones de otros HMOs fucosilados como LNFP I y LNFP III. En contraste con lo dicho, las mujeres que no poseen una FUT2 activa, no secretan HMOs 2'fucosilados y se les llama no-secretoras (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021).

La enzima FUT3 es la responsable de la adición de fucosa mediante enlaces  $\alpha$ 1-3/4 a epítomos de los antígenos del grupo sanguíneo Lewis, está codificada por el gen *Le* y las mujeres con este locus activo se clasifican como Lewis positivo. La FUT3 se encuentra inactiva en otras mujeres por lo que su leche contiene poca cantidad de HMOs con enlaces  $\alpha$ 1-3 o  $\alpha$ 1-4, como la Lacto-N-fucopentaosa II (LNFP II) (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021).

La concentración de HMOs en la leche es menor cuando en la glándula mamaria no se encuentran activas ni la FUT2 ni la FUT3. Basado en las posibles combinaciones entre las actividades de la FUT2 y la FUT3 y en la expresión de los genes *Se* y *Le*, las mujeres (y su leche materna) se pueden clasificar en cuatro grupos (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021):

- 1- FUT2 activa, FUT3 activa: Secretor, Lewis positivo (Se+ Le+)
- 2- FUT2 activa, FUT3 inactiva: Secretor, Lewis negativo (Se+ Le-)
- 3- FUT2 inactiva, FUT3 activa: No-Secretor, Lewis positivo (Se- Le+)
- 4- FUT2 inactiva, FUT 3 inactiva: No Secretor, Lewis negativo (Se- Le-)

### Efectos beneficiosos de los HMOs

#### Establecimiento de la microbiota intestinal

En los primeros años de vida, el intestino es colonizado por  $10^{14}$  células bacterianas. Los oligosacáridos tienen un fuerte impacto y participación en la colonización del intestino por parte de estas bacterias esenciales para la salud. El primer año de vida del lactante es fundamental para el establecimiento del microbioma intestinal, en donde la dieta infantil es uno de los factores más importantes para desarrollarlo (Cheng et al., 2021).

Los HMOs resisten la acidez gástrica y los procesos de hidrólisis en el intestino delgado, por lo que se pueden encontrar altas concentraciones en el intestino grueso y delgado, modulando así la actividad y la composición de la microbiota residente (Cheng et al., 2021).

Los HMOs ayudan al crecimiento de microorganismos beneficiosos como especies del género *Bifidobacterium* dominantes en niños alimentados con leche materna (Cheng et al., 2021). En un estudio realizado *in vitro* se pudo observar que *Bifidobacterium longum* supsp. *infantis* crece bien cuando se cultiva con un grupo de HMOs aislados de la leche humana como única fuente de carbohidratos. En esos cultivos todos los oligosacáridos fueron consumidos completamente. Las concentraciones de 2'FL, 3'FL, LDFT, LNT, LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, LNDFH I y LNDFH II disminuyeron rápidamente cuando las células entraron en fase logarítmica. En este mismo estudio se encontró que *Bifidobacterium longum* supsp. *longum* y *Bifidobacterium breve* sólo pueden consumir lacto-N-tetraosa (LNT) (Asakuma et al., 2011).

Se ha observado mediante varios estudios cómo los HMOs refuerzan la función de barrera intestinal al influir de manera indirecta en la composición de la microbiota intestinal. Se observó en un modelo animal que las bifidobacterias al fermentar los HMOs producían acetato, el cual mejora la función de barrera intestinal, de esta manera se protegía al

hospedador contra la infección causada por *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 (Fukuda et al., 2011).

Algunas bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium infantis* pueden fermentar los HMOs de la leche, los productos que se derivan de este proceso pueden mejorar la función de barrera intestinal, así se pudo observar en un estudio *in vitro* que demostró que los medios condicionados por *Bifidobacterium infantis* (BCM) protegían las células Caco2 de la activación del factor NF- $\kappa$ B por medio de la estimulación de IL-1 $\beta$ . El BCM regula además la expresión proteica de claudina-1 y ocludina, las cuales son responsables de preservar la integridad de la barrera intestinal (Guo et al., 2017).

En otro estudio en donde se cultivó *in vitro* *Bifidobacterium infantis* ATCC15697 con una mezcla de oligosacáridos aislados de leche materna, se pudo observar que esta bacteria poseía una capacidad mayor para adherirse a las células HT-29, lo que indujo una mayor expresión de proteínas de unión estrecha como la ocludina y la molécula de adhesión de uniones intercelulares (JAM-A) en células epiteliales intestinales (Chichlowski et al., 2012).

Las bacterias intestinales pueden degradar oligosacáridos utilizando glucosidasas intracelulares o extracelulares. La degradación intracelular se basa en la absorción de HMOs intactos dentro de la bacteria, mediante proteínas de unión a solutos, una vez en el interior bacteriano las glucosidasas intracelulares los degradan y liberan monosacáridos en el citoplasma. Este tipo de procesamiento puede ser efectuado por *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (Cheng et al., 2021).

La degradación extracelular se basa en las glucosidasas extracelulares unidas a la membrana, las cuales muestran afinidades enzimáticas similares por los HMOs, esta puede ser efectuada por *Bifidobacterium bifidum* y producir azúcares que estimulan el crecimiento de otras especies beneficiosas que utilizan estos carbohidratos como fuente de energía (Cheng et al., 2021; Gotoh et al., 2018).

Los HMOs pueden modular el crecimiento y la fermentación de otras especies bacterianas beneficiosas además de bifidobacterias. En un estudio realizado en humanos, se analizó la interacción entre bifidobacterias y *Eubacterium hallii*, uno de los primeros productores de

butirato en el intestino del bebé. Se pudo demostrar que *Eubacterium hallii* consume los productos de la fermentación realizada por bifidobacterias como acetato, lactato y 1,2-propanediol para posteriormente producir butirato y propionato, ácidos grasos de cadena corta que refuerzan la función de barrera intestinal y el sistema inmune (Schwab et al., 2017).

### Prevención de la infección por patógenos

Los HMOs pueden prevenir la infección por patógenos al actuar como receptores señuelo solubles o inhibiendo el crecimiento de estos patógenos (Cheng et al., 2021).

Los HMOs pueden actuar como señuelos con diferentes virus. El norovirus se encuentra asociado con mucha frecuencia a diarreas en niños, este interactúa en la fase inicial de la infección con oligosacáridos del sistema Lewis secretor, a los cuales se les nombró antígenos de los histogrupos sanguíneos (HBGAs por su nombre en inglés, histo-blood group antigens). Estos HBGAs están presentes en secreciones del tubo digestivo y actúan como señuelo para bloquear sitios específicos de unión del virus al epitelio intestinal. Debido a que los HMOs y los HBGAs comparten semejanzas en la estructura molecular y en la posición de sus monosacáridos, los HMOs interactúan con el virus de manera parecida impidiendo su unión (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b).

Estudios realizados *in vitro* han demostrado que el LNT reduce significativamente la citotoxicidad y unión de *Entamoeba histolytica* a las células epiteliales (Jantscher-Krenn et al., 2012).

Otros estudios han demostrado que los HMOs poseen efectos antimicrobianos y evitan la formación de biopelículas de estreptococos del Grupo B (EGB), que causan infecciones invasivas en recién nacidos. En estos estudios se pudo observar que los HMOs aislados de leche materna inhibieron significativamente el crecimiento de EGB hasta en un 89% y la formación de biopelículas hasta en un 90% (Ackerman et al., 2017; Lin et al., 2017).

Se ha observado que los HMOs de la leche humana tiene efectos antimicrobianos significativos contra *Acinetobacter baumannii* y pueden inhibir su adhesión hasta en un 11%, además pueden evitar que *Staphylococcus aureus* forme biopelículas hasta en un 60% (Ackerman et al., 2018).

### Efecto inmunomodulador

Los HMOs pueden modular el sistema inmune y colaborar en la maduración de este a nivel de la mucosa intestinal de varias maneras, algunas de estas fueron mencionadas en el capítulo 1 de esta revisión (Cheng et al., 2021).

Los HMOs tienen propiedades inmunoestimulantes y promotoras de la maduración celular. Se ha observado en modelos animales que el 3'SL estimula células dendríticas CD11c+ de los ganglios linfáticos mesentéricos e incrementa citocinas que inducen frecuentemente células Th1 y Th17 como el TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-12 y IFN- $\gamma$ . Estudios *in vivo* han demostrado que el LNFP III induce respuestas Th2 y promueve la maduración de células dendríticas 2 (Cheng et al., 2021).

Se desconoce cuáles receptores y vías de señalización están involucrados en la transducción de señales mediado por los oligosacáridos. Sin embargo, algunos estudios sugieren que los HMOs pueden interactuar con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por pattern recognition receptor) e interferir con los procesos del sistema inmune, los efectos inmunomoduladores se pueden dar a través de los TLRs que forman parte de estos PRR (Cheng et al., 2021).

La composición de las distintas mezclas de oligosacáridos puede dar lugar a diferentes tipos de modulación inmune, ya sea para activar o inhibir mecanismos dependiendo de los HMOs involucrados. Por ejemplo, en un estudio realizado *in vitro* se observó que el 3'FL puede activar los TLR2, mientras que el LNT2 podría activar todos los TLRs e inducir IL-10 y TNF $\alpha$  en macrófagos THP1. Además, el 6'SL mostró un efecto sinérgico en la activación de TLR8 inducido por ssRNA40 (Cheng et al., 2019).

Por otra parte, los HMOs también muestran efectos inhibitorios en la señalización de los TLRs. Se ha reportado que el 3'GL, 4'GL y 6'GL son capaces de atenuar la respuesta inflamatoria a través de TLR3 (He et al., 2014). También se ha observado *in vitro* que el 2'FL, 6'SL y LNnT inhibe TLR5 y 7, mientras que el 3'FL inhibe TLR5, 7 y 8 (Cheng et al., 2019).

Los HMOs además de tener impacto en el tracto intestinal también pueden influir en el desarrollo de otros órganos, puesto que alrededor del 1% llegan a circulación sistémica (Plaza-Díaz et al., 2018). Un estudio realizado *in vitro* demostró que una combinación de HMOs aislados de leche materna disminuyó significativamente la internalización de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC por Uropathogenic *Escherichia coli*) en células epiteliales de la vejiga y atenuó los efectos citotóxicos y proinflamatorios inducidos por esta (Lin et al., 2014).

Los HMOs también pueden mejorar la inmunidad innata en infecciones de vías respiratorias. El 2'FL disminuye la carga viral del virus respiratorio sincitial (VRS), además atenúa la producción de citocinas inflamatorias como IL-8 y TNF- $\alpha$  inducidas por este, mientras que el 6'SL regula la disminución de TNF- $\alpha$  en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) infectadas por el virus (Duska-McEwen et al., 2014).

En cuanto a las fórmulas infantiles industriales, estas a menudo se suplementan con carbohidratos no digeribles como los galactooligosacáridos, que se sintetizan enzimáticamente a partir de lactosa y fructooligosacáridos de origen vegetal. Estos carbohidratos se han utilizado para sustituir algunas funciones de los HMOs de la leche materna. Sin embargo, aunque estos oligosacáridos pertenecen a la misma clase química de carbohidratos que los HMOs, no comparten similitudes estructurales, lo que sugiere que no son capaces de llevar a cabo las mismas funciones biológicas que se atribuyen a los HMOs de la leche materna (Morrin et al., 2021).

Las fórmulas lácteas infantiles industriales se basan principalmente en leche bovina que contiene concentraciones más bajas de oligosacáridos en comparación con los HMOs de la leche materna (Morrin et al., 2021).

#### 2.1.b Glicosaminoglicanos (GAGs)

Los glicosaminoglicanos son polisacáridos lineales sulfatados cargados negativamente, formados por unidades de disacáridos repetitivas de ácido urónico o galactosa y uno de dos amino azúcares: N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Estos pueden unirse por enlaces covalentes a estructuras de núcleo proteico para formar proteoglicanos. Los GAGs

se dividen en cuatro clases principales: heparina/ heparán sulfato (HP/HS), condroitín sulfato (CS), queratán sulfato y ácido hialurónico (HA), siendo el HA el único GAG que no se une de manera covalente a una proteína central (Hill & Newburg., 2015; Morrin et al., 2021).

Los GAGs junto con sus proteoglicanos asociados, son el componente predominante de la matriz extracelular. Estos poseen una gran heterogeneidad debido a las numerosas proteínas centrales a las que pueden unirse, las diferencias en la longitud de las cadenas de sacáridos y las diversas reacciones enzimáticas que pueden darse como las N u O sulfataciones de estas cadenas. Debido a esta heterogeneidad, los GAGs están involucrados en numerosas funciones biológicas como la señalización celular, reparación de heridas, coagulación, inmunidad y defensa contra patógenos (Hill & Newburg., 2015; Morrin et al., 2021).

Los niveles de GAGs en la leche materna cambian a lo largo de la lactancia, al día 4 del inicio de la lactancia se puede observar en la leche un pico de 3,8 g/L que disminuye a 0,4 g/L después de un mes, lo que indica la importancia de los GAGs en las dos primeras semanas de vida del bebé. Los GAGs predominantes en la leche humana son el condroitín sulfato y el sulfato de heparina y en cantidades relativamente menores se encuentra el hialuronano y dermatán sulfato. La concentración de GAGs en la leche materna es 7 veces mayor que en la leche bovina (Hill & Newburg., 2015; Morrin et al., 2021).

Los GAGs de la leche materna se sintetizan en la glándula mamaria en forma de proteoglicanos, que son largas cadenas de GAGs unidas a una proteína central específica sintetizados por glicosiltransferasas. Al ingresar al intestino delgado, la proteína central es digerida por enzimas proteolíticas, dejando intactas las cadenas GAG restantes para llegar al intestino grueso. Por lo tanto, al igual que los oligosacáridos de la leche, los GAGs pueden influir en la microbiota intestinal al actuar como receptores señuelo solubles y a través de sus propiedades prebióticas (Iozzo & Schaefer., 2015; Morrin et al., 2021).

La suplementación con GAGs puede prevenir la adhesión de varios microorganismos patógenos a la célula blanco. Se ha demostrado que estos microorganismos tienen preferencia en su unión inicial por las estructuras GAGs, particularmente por el heparán sulfato (HS) que funciona como receptor señuelo (Morrin et al., 2021).

El Syndecan-1 es un proteoglicano compuesto predominantemente por HS, se encuentra en la superficie celular y se expresa en el epitelio intestinal. En diversos estudios se ha investigado el papel de este proteoglicano en las interacciones de la microbiota entérica con el epitelio intestinal y de bacterias patógenas que podrían utilizar el enterocito como puerta de entrada para la infección sistémica. Se ha visto que en los enterocitos HT-29 (que expresan Syndecan-1 en altos niveles) pretratados con heparina (un análogo del heparán sulfato) se redujo la internalización de varios patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* (60%-80% de inhibición) (Henry-Stanley et al., 2003, 2005; Morrin et al., 2021).

Se ha demostrado que los GAGs modulan eficazmente la superficie de las células intestinales y protegen contra la colonización bacteriana. Un ejemplo de esto se puede ver en un estudio en donde se examinó la acción antimicrobiana de varios GAGs contra aislamientos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. Se observó que tras la incubación previa de estas bacterias con heparina (HP) y condroitín sulfato B (CS-B) solubles (GAGs altamente sulfatados), se redujo la adherencia de *Staphylococcus aureus* a las células Vero y Hep-2, mientras que con el condroitín sulfato A (CS-A) y el condroitín sulfato C (CS-C) solubles (GAGs menos sulfatados), se redujo la adherencia de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* (Hafez et al., 2008; Morrin et al., 2021).

En otro estudio en donde se hizo un pretratamiento durante 24 horas a células HT-29 con hialuronano (HA) de leche humana para reducir indirectamente la adhesión de *Salmonella typhimurium*, se observó *in vitro* que los niveles de expresión del péptido antimicrobiano H $\beta$ D2 fueron más altos tras la exposición de la línea celular al HA y se vio el mismo resultado *in vivo* en la mucosa intestinal de ratones a los que se les había administrado HA previamente (Hill et al., 2013).

En otra investigación se demostró que la línea celular T84 pretratada durante 48 horas con condroitín sulfato, condujo a una reducción del 75 % tanto en la adhesión como en la invasión de *Escherichia coli* enteropatógena cepa SCB34 (Burge et al., 2019).

Los GAGs pueden funcionar indirectamente contra la infección bacteriana al prevenir una respuesta inmunológica exacerbada y el daño intestinal posterior. Se ha visto que la suplementación con CS comercial reduce la producción de citoquinas proinflamatorias y atenúa la actividad del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B en macrófagos THP-1 expuestos a LPS. La HP también se considera un agente antiinflamatorio eficaz tanto en la enfermedad inflamatoria intestinal, como en la colitis ulcerosa (Mousavi et al., 2015; Stabler et al., 2017).

El HS y otros GAGs altamente sulfatados también se han implicado en la inhibición de diversas infecciones virales en estudios realizados en líneas celulares *in vitro*, debido a que son objetivos de los virus para la unión y entrada inicial. En un estudio se demostró que el HP comercial reduce significativamente la unión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) a las células MT-4 y previene la destrucción celular. También se ha evidenciado que el CS de la leche humana impide la unión de la glicoproteína de envoltura viral gp120 del VIH a su receptor celular CD4, durante el primer paso en el proceso de entrada del virus a la célula blanco (Baba et al., 1988; Morrin et al., 2021; Newburg et al., 1995).

## **2.2 Proteínas**

Una de las particularidades de las proteínas de la leche materna es que están presentes de forma inversamente proporcional a la capacidad de producción del bebé, y pueden disminuir con el tiempo a medida que aumentan las defensas del lactante o pueden incrementar en caso de necesidad. Por ejemplo, se han demostrado niveles más altos de lactoferrina en la leche materna de las madres que amamantan a bebés enfermos (Quitadamo et al., 2021; Riskin et al., 2012).

La leche materna contiene más de 1700 proteínas en concentraciones cambiantes a lo largo de la lactancia para satisfacer las necesidades del lactante en desarrollo, desempeñan roles funcionales en la protección del niño; proporcionan nutrición, estimulan la absorción de nutrientes, poseen actividad enzimática, modulan el microbioma intestinal, pueden estimular la proliferación celular y tienen funciones biológicas que van desde efectos antimicrobianos hasta inmunoestimuladores (Demmelmair et al., 2017; Perrella et al., 2021; Quitadamo et al., 2021).

La composición de las proteínas de la leche humana las hace 100% asimilables por el organismo del lactante, y se dividen en tres grupos principales: caseínas, proteínas del suero y proteínas ligadas a la membrana del glóbulo de grasa de la leche (mucinas, lactoadherina entre otras). Aproximadamente el 30% de la proteína total es caseína y el 70% corresponde a las proteínas del suero constituidas principalmente por lactoferrina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, inmunoglobulinas (SIgA en mayor proporción) y lisozima. Las proteínas del suero están más concentradas en el calostro; mientras que, en la leche madura, equivalen al 60% (Chong et al., 2022; Perrella et al., 2021; Quitadamo et al., 2021; Zheng et al., 2022).

Es importante aclarar que en las siguientes secciones se describirán las bioactividades de las distintas proteínas mediante el uso de ejemplos de estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*. Debe reconocerse que las proteínas estudiadas son en gran parte de origen bovino y no son idénticas a sus contrapartes humanas. Sin embargo, en muchos casos, la estructura de las proteínas de la leche bovina comparten un alto grado de homología con las proteínas de la leche humana, lo que en varios casos da como resultado algunas similitudes en la estructura de la proteína, equivalencias respecto a la bioactividades de ambas y la estabilidad frente a la proteólisis en el tracto gastrointestinal de los recién nacidos, por lo que es posible comparar sus efectos para el estudio de la funcionalidad de las proteínas a describir (Chatterton et al., 2013; Lönnerdal, 2016).

A continuación, se describirán las distintas bioactividades de la caseína y de las principales proteínas del suero de la leche materna mencionadas anteriormente, además se incluye las propiedades de la osteopontina. También se analizará la membrana del glóbulo de grasa de la leche, que corresponde a un componente de la leche especial, ya que está constituida por un conjunto de lípidos y proteínas. Se verá la función de las proteínas más importantes asociadas a esta membrana, pero también se describirá la función de los lípidos asociados a ella en esta sección.

## 2.2.a Caseínas

Las caseínas contribuyen al aporte de aminoácidos en la leche humana y son altamente digeribles. Su propiedad más importante es su capacidad para formar agregados estables que incluyen calcio y fósforo, esto permite mayores concentraciones de estos minerales en la

leche humana. La caseína adopta la forma de micelas en dispersión coloidal, las micelas que se forman en la leche humana varían en tamaño de 20 a 55 nm, en comparación con las de la leche bovina que tienen un diámetro de 100 a 150 nm (Hendricks & Guo, 2021).

Los niveles de caseínas y proteínas del suero cambian en las primeras etapas de la lactancia. Al inicio de la lactancia, la concentración de proteínas del suero es alta y la caseína es prácticamente indetectable. Sin embargo, a medida que avanza la lactancia, aumenta la síntesis de caseína en la glándula mamaria y el volumen de leche producido, mientras que la concentración de proteínas del suero disminuye, en parte debido al mayor volumen de leche. El perfil de aminoácidos de las caseínas y el de las proteínas del suero es diferente; por lo tanto, el perfil general de aminoácidos de la leche humana varía durante la lactancia (Hendricks & Guo, 2021).

La principal subunidad de caseína que se encuentra en la leche materna es la  $\beta$ -caseína, una proteína altamente fosforilada. Durante la digestión forma fosfopéptidos capaces de aumentar la absorción de calcio al incrementar su solubilidad, lo que se suma a la alta biodisponibilidad de calcio en la leche materna. Además, cerca del extremo N-terminal de la  $\beta$ -caseína se pueden encontrar grupos de residuos de treonina y serina fosforilados, que pueden causar la formación de iones de calcio complejos. Los fosfopéptidos de caseína también pueden contribuir a la absorción de zinc y otros cationes divalentes (Hendricks & Guo, 2021; Lönnerdal, 2017).

La parte restante de la caseína en la leche materna es principalmente kappa caseína ( $\kappa$ -caseína) y solo una pequeña fracción consiste en  $\alpha$ 1-caseína. A diferencia de la  $\beta$ -caseína, la  $\kappa$ -caseína está altamente glicosilada y alrededor del 40% de su masa molecular son carbohidratos como oligosacáridos complejos. Estos carbohidratos complejos tienen estructuras similares a las de la superficie de la barrera epitelial del intestino delgado que a menudo sirven como sitios de unión para los patógenos. Por lo tanto, se ha sugerido que actúan como "señuelos", evitando así la unión y la invasión de estos. Más específicamente el fragmento proteolítico inmediato de la  $\kappa$ -caseína denominado glicomacropéptido (GMP) sirve como receptor señuelo y se une a patógenos evitando la infección (Lönnerdal, 2016, 2017).

Se ha demostrado que la  $\kappa$ -caseína inhibe la adherencia de *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica humana y de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* a las células epiteliales del tracto respiratorio humano. También promueve el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum*, un anaerobio productor de ácido que reduce el crecimiento de microorganismos patógenos intestinales en lactantes, debido a la presencia de GMP (Aniansson et al., 1990; Azuma et al., 1984; Hamosh, 2001; Hendricks & Guo, 2021; M et al., 1995).

### 2.2.b $\alpha$ -lactoalbúmina

La  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) es la proteína predominante en la leche humana, constituye el 22 % de la proteína total y representa el 36 % de las proteínas del suero. Esta posee un papel tanto bioquímico como nutricional en el desarrollo infantil temprano. Además, es una proteína importante en la producción de leche materna. Se produce en las células epiteliales de la glándula mamaria y se combina con la enzima  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa (GT-1) para formar lactosa sintasa, que convierte la glucosa y la galactosa en lactosa (Layman et al., 2018; Morrin et al., 2021).

Es importante mencionar que la  $\alpha$ -La humana y bovina comparten un alto grado de homología estructural (72%) y sus secuencias de aminoácidos son similares, por lo tanto, sus bioactividades son semejantes. Lo anterior nos ayuda a comparar a grandes rasgos los beneficios vistos en estudios donde se utiliza la proteína de origen bovino con la proteína en leche humana (Layman et al., 2018; Lönnerdal, 2017; Morrin et al., 2021).

La  $\alpha$ -La proporciona una rica fuente de péptidos bioactivos y numerosos aminoácidos esenciales importantes para la nutrición infantil temprana, incluidos el triptófano, lisina, cisteína, leucina, isoleucina, valina y aminoácidos que contienen azufre. Además, los péptidos derivados de la hidrólisis de la  $\alpha$ -La desempeñan un papel importante en la defensa contra patógenos (Layman et al., 2018; Lönnerdal, 2017; Morrin et al., 2021).

Estos péptidos bioactivos se forman después de la digestión parcial de la  $\alpha$ -La en la parte superior del tracto gastrointestinal (estómago y duodeno), pero pueden ejercer funciones durante su paso por la parte más distal del intestino delgado (yeyuno e íleon), así como en el

colon donde también pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la microbiota intestinal. Se sabe que la  $\alpha$ -La se digiere y absorbe como pequeños péptidos y aminoácidos, ya que no se ha encontrado de forma intacta en las heces de los lactantes. Sin embargo, algunos péptidos pueden resistir la digestión y son demasiado pequeños para ser detectados en las heces por métodos inmunológicos (Lönnerdal, 2014).

Se ha evidenciado que los péptidos bactericidas generados a partir de la digestión proteolítica de  $\alpha$ -La bovina, utilizando pepsina, tripsina y quimotripsina, producen la inhibición del crecimiento de varias bacterias Gram negativas a través de la interacción directa. También se ha observado actividad contra bacterias Gram positivas. Se demostró la inhibición del crecimiento en diversos grados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, bacterias del género *Streptococcus* y *Bacillus subtilis* cuando fueron incubados con los productos de la digestión de  $\alpha$ -La (Morrin et al., 2021; Pellegrini et al., 1999). Además, se ha demostrado que las fracciones peptídicas de la  $\alpha$ -lactoalbúmina evitan que bacterias enteropatógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* se adhieran a las células intestinales, por lo tanto, pueden prevenir infecciones (Layman et al., 2018).

La  $\alpha$ -La también puede funcionar indirectamente contra los patógenos al mejorar la respuesta inmune innata. Existe un tripéptido inmunoestimulador conocido como GLF (Gly-Leu-Phe) presente en la  $\alpha$ -La humana y bovina, este se libera mediante la digestión *in vitro* de la caseína y de  $\alpha$ -La. Se ha observado que este tripéptido estimula la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales murinos *in vitro* y ejerce un efecto protector contra la infección por *Klebsiella pneumoniae* en ratones. También estimula la fagocitosis de los macrófagos humanos, lo que provoca la destrucción de bacterias (Jaziri et al., 1992; Lönnerdal, 2014; Migliore-Samour et al., 1992).

Aunque las observaciones mencionadas se han realizado *in vitro*, es posible que estos pequeños péptidos se formen en el intestino superior *in vivo*, resistan una mayor digestión y ejerzan sus actividades antibacterianas en el intestino inferior (colon). Esto puede explicar un hallazgo de un estudio, donde se observó que los monos rhesus lactantes alimentados con fórmula suplementada con  $\alpha$ -La de origen bovino demuestran una mayor capacidad para contrarrestar la infección por *Escherichia coli* enteropatógena con una reducción de la diarrea

observada. También se observó un perfil de microbiota similar al de los monos amamantados cuando se suplementó la fórmula con  $\alpha$ -La (Brück et al., 2003; Lönnerdal, 2014).

La actividad antimicrobiana de los péptidos de  $\alpha$ -La puede estar asociada, al menos en parte, con los 4 puentes disulfuro dentro de la proteína. La digestión de  $\alpha$ -La con tripsina produce 2 pentapéptidos unidos por un puente disulfuro, que exhiben propiedades antimicrobianas, mientras que los péptidos individuales no muestran estas propiedades (Pellegrini et al., 1999).

Se ha demostrado que otros péptidos derivados de la hidrólisis de  $\alpha$ -La tienen actividad prebiótica al estimular el crecimiento de bifidobacterias (Layman et al., 2018). En el microbioma de los lactantes amamantados predominan especies del género *Lactobacillus* y en particular, un grupo diverso de especies del género *Bifidobacterium*, mientras que el microbioma de los lactantes alimentados con fórmula tiene una composición más similar a la de los adultos. Se cree que las bifidobacterias protegen a los bebés de ciertas enfermedades gastrointestinales causadas por una variedad de patógenos como las enterobacterias (Harmsen et al., 2000; Le Hurou-Luron et al., 2010; Roger et al., 2010).

Las acciones combinadas de los péptidos prebióticos que estimulan una microbiota beneficiosa y los péptidos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de patógenos pueden dar como resultado un microbioma, que en sí mismo puede afectar las respuestas inmunológicas (Brück et al., 2002; Lönnerdal, 2014).

### 2.2.c Lactoferrina

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína de 80 kDa y pertenece a la familia de proteínas no hémicas conocidas como transferrinas por su capacidad de captación de hierro, cobre, zinc, manganeso y galio. Se encuentra ampliamente presente en diversas secreciones de mamíferos como la leche, saliva, lágrimas, secreciones bronquiales e intestinales y en los gránulos secundarios de neutrófilos, que cuando son activados durante los procesos inflamatorios liberan el contenido de estos gránulos directamente al plasma (Chatterton et al., 2013; Xu et al., 2022).

La lactoferrina es una de las proteínas del suero predominantes en la leche humana, es secretada también por las células epiteliales del tejido mamario. Se ha demostrado que realiza

una amplia gama de funciones que protegen al recién nacido de infecciones y contribuye a la maduración de su sistema inmune innato y adaptativo. De manera más precisa, la LF es la segunda proteína más abundante en la leche materna y sus propiedades biológicas abarcan actividades antimicrobianas contra distintos microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos. Además, participa en la regulación de la proliferación y diferenciación celular y posee actividad enzimática, antiinflamatoria, antioxidante, inmunomoduladora y anticancerígena (Liu et al., 2019; Liu, Feng et al., 2021; Mastromarino et al., 2014; Quitadamo et al., 2021; Riskin et al., 2012; Xu et al., 2022).

La primera característica descubierta y la más conocida de la LF es su propiedad antibacteriana, ha mostrado tener actividad inhibitoria de amplio espectro contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos. La LF Inhibe de manera eficaz el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*. Clínicamente el tratamiento oral con LF inhibe el crecimiento de anaerobios gastrointestinales y estimula la proliferación de bacterias probióticas (de Sá Almeida et al., 2020; Xu et al., 2022).

La lactoferrina tiene una estructura similar a la de la transferrina sérica (~60%), por lo que puede unirse reversiblemente con iones férricos ( $Fe^{3+}$ ). Mejora el metabolismo del hierro y al ser un transportador de este, protege al sistema nervioso y reduce el estrés oxidativo (Liu et al., 2021).

El efecto bacteriostático de la lactoferrina se atribuye a su capacidad de unión con el hierro libre, el cual es un elemento esencial para el crecimiento bacteriano (Liu, Feng et al., 2021). La mayor parte del hierro en la leche materna se une a la lactoferrina y otra parte se asocia con los glóbulos de grasa en la leche, caseína y compuestos de bajo peso molecular como el citrato (Demmelmaier et al., 2017).

Por otro lado, la LF puede servir como donante de hierro para apoyar el crecimiento de algunas bacterias con menores demandas de hierro como *Lactobacillus sp.*, o *Bifidobacterium sp.*, lo que se considera como un efecto beneficioso (Liu, Feng et al., 2021).

Una parte de la LF resiste a la digestión en el estómago mientras que otra parte se digiere por la pepsina y libera un potente antibiótico peptídico llamado lactoferrina a partir de la LF nativa. Este péptido actúa contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos filamentosos, levaduras y parásitos protozoarios. Es un péptido catiónico de bajo peso molecular que se compone de 25 residuos de aminoácidos que corresponde al dominio N-terminal, la cual es una región distinta a la de unión de hierro, debido a esto, su mecanismo citotóxico es independiente de este ión (Liu et al., 2019; Quitadamo et al., 2021).

La lactoferrina liberada a partir de la LF puede unirse a las moléculas del LPS de bacterias Gram negativas y liberarlo de la membrana de manera semejante que lo hace la proteína nativa, ya que, de los 25 residuos de aminoácidos, ocho son básicos. De esta manera, se colapsa el potencial de membrana y su integridad, lo que aumenta la permeabilidad en la membrana celular de los microorganismos e incrementa la susceptibilidad a las enzimas lisosomales y agentes antibacterianos, provocando su ruptura, lisis y muerte (Quitadamo et al., 2021).

Se ha observado que la lactoferrina puede inhibir la adherencia y la formación de biopelículas en la infección provocada por *Escherichia coli*, al unirse a las porciones lipídicas de la capa de LPS y a través de la degradación de las proteínas de virulencia ancladas a la membrana externa (Ochoa et al., 2006). Se ha demostrado *in vitro* que la LF es capaz de inhibir la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, ya que, en ausencia del hierro, esta bacteria tiene poca movilidad, lo que resulta en la imposibilidad de adhesión a la superficie (Telang, 2018). Además, la actividad proteolítica de la LF es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de *Shigella flexneri* o bacterias enteropatógenas (Henrick et al., 2017).

La LF puede ser el componente que más se asocia con las funciones antiinfecciosas de la leche materna. Existe una base sólida de investigación experimental que respalda el uso de la lactoferrina para promover el establecimiento de respuestas inmunológicas y defensivas en neonatos y bebés pequeños. Se ha observado evidencia sólida proveniente de ensayos clínicos que confirma sus propiedades. Por ejemplo, se ha demostrado *in vitro* que la LF inhibe la replicación de citomegalovirus, HSV, VIH, virus de hepatitis B y C, hantavirus, virus del papiloma humano, rotavirus, adenovirus e influenza A (Berlutti et al., 2011; Quitadamo et al., 2021).

La LF también se ha estudiado por sus propiedades antivirales, algunas de ellas se expresan a través de la unión de la LF a moléculas de unión inicial para algunos virus, como los proteoglicanos que se encuentran en la superficie celular como el heparán sulfato, al que tiene una alta afinidad a través de sus dominios de unión a glicosaminoglicanos en el extremo N-terminal, bloqueando de esta manera la entrada de ciertos virus a la célula. Por ejemplo el virus del herpes simple, deteniendo así la infección en sus primeras etapas (Telang, 2018). Además, se ha visto que previene la infección por VHC, ya que se ha demostrado una interacción directa de la LF con las proteínas de envoltura E1 y E2 del virus (Berlutti et al., 2011).

Se ha observado que la lactoferrina también tiene efectos en hongos como *Candida*, ya que causa perturbaciones en la pared celular con la formación de poros en la superficie, hinchazón y el colapso celular (Telang, 2018).

La lactoferrina juega un papel clave en la defensa del recién nacido al modular la respuesta inmune innata y adaptativa en las infecciones (Telang, 2018). Los efectos en la respuesta inmune innata están relacionados con su capacidad para unirse a los PAMPs presentes en los microorganismos patógenos. Por ejemplo, el LPS en bacterias Gram negativas o peptidoglicanos en bacterias Gram positivas (Telang, 2018).

Los PAMPs son reconocidos por PRRs como lo son los TLRs, clave para la activación de la inmunidad innata. Se ha demostrado que el TLR4 se une y transfiere LPS al receptor celular CD14, con la ayuda de la proteína de unión a LPS (LBP). El CD14 es una proteína de membrana presente en las células mieloides que lleva a su activación y a la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-1 $\beta$  (Telang, 2018).

La LF al unirse a diferentes PAMPs como el LPS, compite con la LBP, inhibiendo la liberación de citocinas proinflamatorias. La LF también puede modular el reclutamiento de células inmunes interfiriendo con la expresión de las moléculas de adhesión de células endoteliales, requerida para el reclutamiento de estas células inmunes a los sitios de inflamación, como lo muestran los estudios que indican que la interferencia de la lactoferrina en la interacción LPS-CD14 puede inhibir la expresión de E-selectina, ICAM-1 e IL-8 por

parte de las células endoteliales de la vena umbilical humana (Elass et al., 2002; Legrand, 2016; Quitadamo et al., 2021).

La lactoferrina por otra parte también es capaz de mejorar la activación de las células del sistema inmune cuando se une a objetivos diferentes. El aumento de la actividad celular lítica es un papel clave desempeñado por la lactoferrina. La unión de LF a los receptores presentes en los macrófagos los activa para liberar moléculas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-8 y óxido nítrico, además aumenta su actividad fagocítica cuando es infectado (Quitadamo et al., 2021). En un estudio realizado con LF bovina, se observó que aumenta la destrucción fagocítica de *Staphylococcus aureus*, por la activación de la vía alternativa del complemento por medio de su dominio lactoferricina (Kai et al., 2002; Quitadamo et al., 2021).

La LF posee un papel inmunomodulador importante en la activación de las células presentadoras de antígeno (CPA) y en sus funciones en la respuesta inmune adaptativa al afectar el desarrollo de las células T. Por ejemplo, la LF al mejorar la capacidad de los macrófagos para funcionar como CPA estimula la producción de citocinas, como la IL-12, responsable de modular el desarrollo de las células T. La IL-12 mejora la producción y proliferación de IFN- $\gamma$ , aumenta la actividad citotóxica de los linfocitos responsables de la inmunidad innata (células NK) y adaptativa (células TCD4+ y TCD8+) y es un importante impulsor del desarrollo de células Th1 (Actor et al., 2009; Telang, 2018; Trinchieri, 2003).

Por otra parte, la LF puede actuar como un factor inmunoestimulador en el sistema inmune de la mucosa, se ha visto que la administración por vía oral aumenta el conjunto de células TCD4+, los niveles de inmunoglobulina (A y G), así como la proliferación de las placas de Peyer del intestino (Sfeir et al., 2004; Siqueiros-Cendón et al., 2014).

Todos estos estudios ilustran las múltiples funciones realizadas por la LF para modular el sistema inmune neonatal y destacan la importancia de esta proteína en el desarrollo de una respuesta inmune madura y en la protección del recién nacido contra las infecciones (Telang, 2018).

#### 2.2.d Lisozima

La lisozima forma parte del grupo de las hidrolasas glucosídicas, es una glicoproteína que contiene 130 aminoácidos y posee principalmente efectos antibacterianos. Su concentración en la leche materna es alta (3000 veces mayor que en la leche bovina), y a diferencia de otras proteínas protectoras en la leche (anticuerpos y lactoferrina), las concentraciones de lisozima aumentan constantemente con la lactancia prolongada. Es secretada por neutrófilos y macrófagos y está presente en muchas secreciones corporales en el adulto como saliva, lágrimas entre otros (Gálvez-Iriqui et al., 2020; Lawrence, 2022; Lönnerdal, 2017).

La lisozima degrada la pared celular exterior de las bacterias Gram positivas al catalizar la hidrólisis del enlace  $\beta$  (1-4) glucosídico entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico en el peptidoglicano bacteriano. Además, la lisozima tiene un efecto sinérgico con la lactoferrina en la leche materna sobre las bacterias Gram negativas. La microscopía electrónica muestra que la lactoferrina por su alta afinidad hacia el LPS se une a este constituyente de la membrana externa y crea poros a través de los cuales la lisozima puede penetrar y degradar la matriz interna de proteoglicanos, matando así a las bacterias Gram negativas. Estas 2 proteínas (lactoferrina y lisozima), a través de sus efectos directos sobre los patógenos, ayudan a prevenir la inflamación excesiva en la superficie intestinal del lactante (Ellison & Giehl, 1991; Gálvez-Iriqui et al., 2020; Hendricks & Guo, 2021; Jana et al., 2017; Lönnerdal, 2017; Thai & Gregory, 2020).

#### 2.2.e Inmunoglobulinas

Cuando nace un bebé está expuesto a una gran cantidad y diversidad de virus, bacterias, hongos y antígenos ambientales de los que estaba protegido en la placenta. Al carecer de un sistema inmune maduro, el recién nacido depende en gran medida de las fuentes de inmunidad derivadas de su madre para distinguir los microorganismos comensales de los patógenos. Estas fuentes de inmunidad se transfieren al lactante a través de la placenta y la leche materna. Por medio de la placenta la inmunidad materna se transfiere principalmente como inmunoglobulina G (IgG), que pasa directamente al suero de los bebés y es fundamental en la protección contra infecciones infantiles como influenza, tosferina y tétanos (Atyeo & Alter, 2021).

Los anticuerpos transferidos a través de la placenta disminuyen durante el primer año de vida, ya que la vida media promedio de la IgG es de 21 días, aunque la cinética de disminución varía según la especificidad de antígeno, debido probablemente a diferencias en la porción Fc del anticuerpo. Sin embargo, los bebés continúan recibiendo un suministro de inmunidad a través de la leche materna (Atheyo & Alter, 2021).

Los anticuerpos presentes en la leche materna desempeñan funciones fundamentales en la protección de los recién nacidos contra infecciones neonatales, favorecen el establecimiento de una microbiota saludable y además participan en el desarrollo de la tolerancia inmunológica hacia los antígenos de la mucosa, lo que señala su papel crítico en la organización microbiana y la educación del sistema inmune (Atheyo & Alter, 2021).

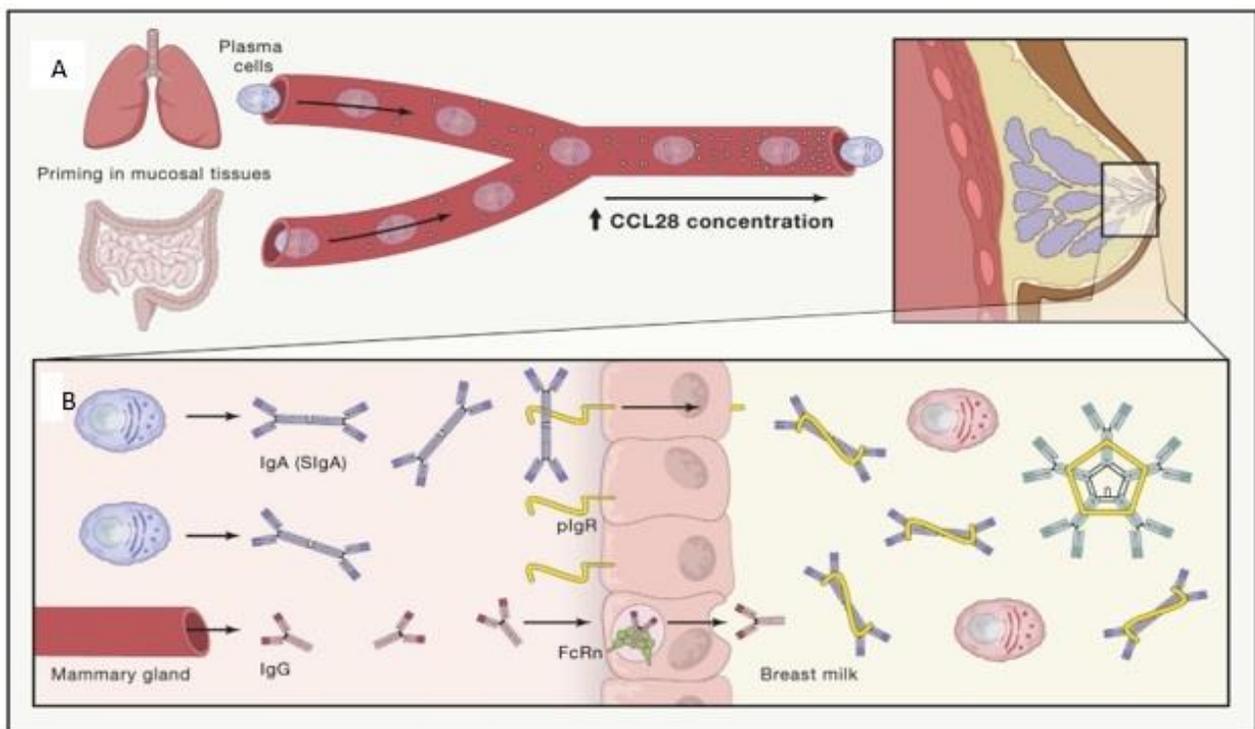
La leche materna contiene todos los isotipos de inmunoglobulinas, siendo la inmunoglobulina A (IgA) la que se encuentra en mayor concentración, esta representa del 80% al 90% del total de inmunoglobulinas en la leche humana, seguida por la IgM y la IgG, esta última presente en bajas concentraciones, por lo que se abordará en este apartado principalmente la IgA (Zheng et al., 2022).

La IgA se encuentra en concentraciones más altas en las secreciones mucosas y es la segunda inmunoglobulina más abundante en la sangre. La IgA se puede encontrar en forma monomérica, dimérica o trimérica, predominando la forma monomérica en el suero y la forma polimérica en las secreciones externas, donde se denomina IgA secretora (SIgA). La SIgA contiene un polipéptido llamado cadena de unión (J) que es producido por las células plasmáticas de la mucosa y une dos o tres moléculas de IgA, y el componente secretor que protege al complejo molecular frente a la acción de las proteasas abundantes en el tracto digestivo (Zheng et al., 2022).

La SIgA se encuentra en todas las secreciones externas y en las membranas mucosas, aunque las concentraciones más altas se pueden hallar en el calostro y la leche. En los primeros días de lactancia la SIgA y SIgM están presentes en concentraciones altas, la SIgA alcanza concentraciones entre 10 y 20 g/l, esto es de 4 a 5 veces mayor que la concentración de IgM, y de 20 a 30 veces mayor que las concentraciones de IgG (Zheng et al., 2022).

Los anticuerpos en la leche materna no pueden llegar directamente a la circulación en bebés nacidos a término debido a que los enterocitos no permiten el paso de estas macromoléculas, por lo que la función principal de estas inmunoglobulinas es proporcionar inmunidad de barrera en los lactantes (Atheyo & Alter, 2021).

La IgA de la leche materna es producida por células plasmáticas que se acumulan en las glándulas mamarias. Estas células plasmáticas productoras de IgA y que expresan la molécula CCR10 se preparan en los ganglios linfáticos y en las placas de Peyer de los tejidos mucosos de la madre y viajan a las glándulas mamarias debido a la expresión de la quimiocina CCL28 de la mucosa en la glándula mamaria, la cual es regulada por las células epiteliales de la glándula mamaria durante la lactancia (Figura 9A) (Atheyo & Alter, 2021; Brandtzaeg, 2010).

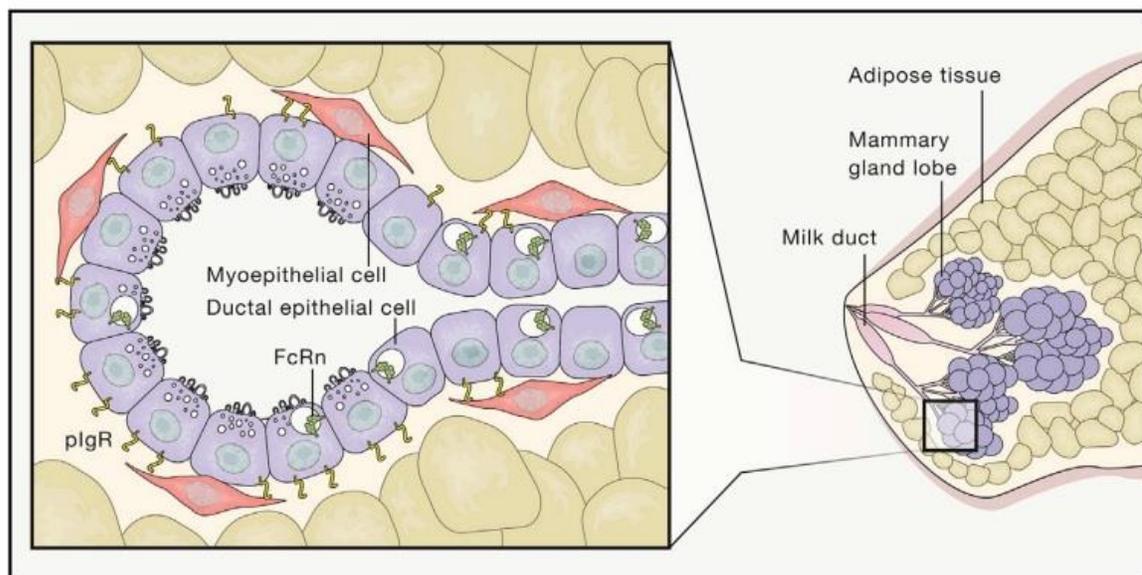


**Figura 9. Transferencia de anticuerpos a la leche materna** A) Las células plasmáticas provenientes de tejidos mucosales llegan a la glándula mamaria siguiendo un gradiente de quimiocina CCL28 generado por el tejido mamario en evolución. B) Estas células plasmáticas producen IgA (IgAS) e IgM, que pasan a la leche materna a través del receptor polimérico de Ig (pIgR) en el epitelio mamario. La IgG que proviene de la sangre se transfiere a la leche materna a través del receptor FcRn expresado en las células del epitelio mamario (Tomado de Atheyo & Alter, 2021).

Por lo tanto, las células plasmáticas generadas previamente en la mucosa materna se alojan en las glándulas mamarias para formar parte de la leche materna recién formada. El mecanismo preciso y la selección de este reclutamiento aún no se conocen por completo. Dado que la IgA se origina a partir de células B activadas (células plasmáticas) en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) tanto en el intestino como en las vías respiratorias de la madre, existe evidencia de que una gran fracción de la IgA secretora de leche materna tiene especificidades hacia antígenos comensales, patógenos intestinales (por ejemplo, *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* enteropatógena) y respiratorios (Durand et al., 2013; Gopalakrishna et al., 2019; Nathavitharana et al., 1994; Schlaudecker et al., 2013).

Debido a lo mencionado anteriormente la leche materna faculta al recién nacido con una barrera inmunológica en la mucosa similar a la de la madre, es como extraer el “archivo inmunológico” de la mucosa materna y transferir anticuerpos al bebé capaces de proporcionar una barrera contra los mismos antígenos que se encuentran en el entorno inmediato de la madre, que probablemente sean con lo que se encuentre el neonato (Ateyo & Alter, 2021).

La glándula mamaria es una estructura epitelial ramificada, que consta de conductos galactóforos que transportan la leche y alvéolos que participan en la síntesis y suministro de leche al recién nacido (Figura 10). Las paredes del conducto y los alvéolos están compuestas por dos capas de células epiteliales: una capa luminal de células epiteliales cuboidales y una capa basal de células mioepiteliales (Ateyo & Alter, 2021).



**Figura 10. Anatomía de la glándula mamaria.** La glándula mamaria consta de conductos lácteos que terminan en los lóbulos. Durante la lactancia, este sistema de conductos ramificados se expande para apoyar la producción de leche. Las paredes de los conductos de la glándula mamaria constan de dos tipos de células epiteliales: células epiteliales cuboidales y células mioepiteliales. Los lóbulos de la glándula mamaria constan de 10 a 20 alvéolos. La producción de leche se da en los alvéolos por lactocitos que se diferencian de las células epiteliales de los conductos durante la lactancia. Las células epiteliales expresan los receptores pIgR y FcRn, que dirigen el transporte de anticuerpos maternos a la leche materna (Tomado de Atyeo & Alter, 2021).

Las células epiteliales de los conductos y los alvéolos expresan el receptor polimérico de inmunoglobulina (pIgR) también conocido como componente secretor de membrana en su lado basolateral y expresan el receptor neonatal para el Fc (FcRn) de manera endosomal (Figura 9B) (Atyeo & Alter, 2021).

El receptor pIgR es fundamental para el paso de SIgA y SIgM a la leche materna. La IgA o IgM polimérica se unen a este, luego el complejo sufre endocitosis, seguido del transporte vesicular a la superficie apical de la célula epitelial donde pIgR se separa por proteólisis entre su dominio externo y el que se encuentra en el interior de la membrana, liberando IgA o IgM aún unidas al dominio externo de pIgR. Este dominio externo de pIgR es el componente secretor y desempeña un papel fundamental en la protección de los anticuerpos secretores contra la proteólisis en el intestino, particularmente en SIgA donde se une covalentemente (Atyeo & Alter, 2021; Zheng et al., 2022).

En la leche materna madura también se libera una cantidad significativa del componente secretor libre y se ha demostrado que su naturaleza altamente glicosilada muestra protección *in vitro* contra la toxina A de *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* y comensales Gram positivos (Mathias & Corthésy, 2011).

Los estudios que han analizado la acumulación de células plasmáticas en la glándula mamaria durante la lactancia se han enfocado en células plasmáticas productoras de IgA. Pocos estudios han examinado el origen de la IgG en la leche materna, sin embargo, se plantea la hipótesis de que el receptor FcRn juega un papel importante en el paso de IgG a la leche materna. Además, es probable que algunos anticuerpos en la leche materna surjan de las células plasmáticas que se transfieren al seno mismo, capaces de formar parte del sistema inmune neonatal por un corto tiempo (Atyeo & Alter, 2021).

## Función de la SIgA en la homeostasis del microbioma

Numerosas investigaciones demuestran que la composición del microbioma tiene un profundo impacto en la salud y el desarrollo a largo plazo de un individuo. Los estudios han sugerido que el establecimiento adecuado del microbioma durante la infancia puede prevenir enfermedades diarreicas, enfermedad inflamatoria intestinal en la edad adulta, asma, alergias y la evolución de enfermedades autoinmunes (Gülden et al., 2015; Johnson & Ownby, 2017).

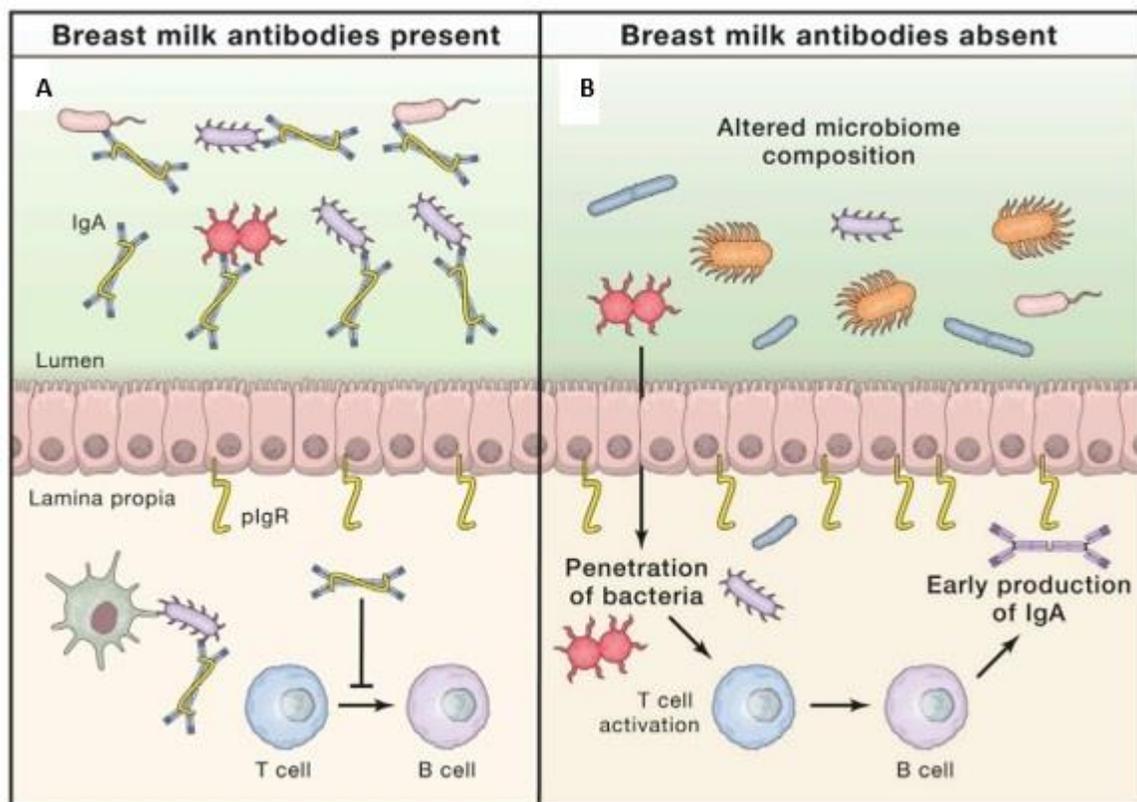
La mayor exposición al microbioma ocurre a la hora del nacimiento, cuando el bebé está expuesto a una gran cantidad de microorganismos que provienen del canal vaginal de la madre, el microbioma derivado de la piel durante la lactancia, la leche materna y el medio ambiente, lo que hace que la ventana de tiempo inmediatamente posterior al nacimiento sea crucial para la selección de microorganismos beneficiosos de los que no (Ateyo & Alter, 2021).

La SIgA juega un papel fundamental en el establecimiento y mantenimiento del microbioma en la infancia. Se cree que gran parte de la SIgA en la mucosa es no específica y posee una alta reactividad cruzada, lo que amplía su capacidad de interactuar con la microbiota (Bunker et al., 2017). Además, algunos estudios sugieren que la SIgA puede unirse a antígenos de manera independiente a la porción Fab del anticuerpo a través de azúcares en la porción Fc, en el componente secretor y en la cadena J, lo que permite una amplia reactividad de esta inmunoglobulina a los antígenos. Se sabe que estos anticuerpos desempeñan un papel esencial al proporcionar la primera línea de defensa contra los microorganismos ambientales, esto reduce la necesidad de la eliminación de antígenos exógenos por parte de la inmunidad sistémica proinflamatoria (Binsker et al., 2020; Brandtzaeg, 2010; Mathias & Corthésy, 2011).

Tanto la SIgA como la SIgM están involucradas en un proceso inmunológico conocido como exclusión inmune (Brandtzaeg, 2010). A través de este mecanismo la SIgA atrapa microorganismos e inhibe la penetración de material extraño dañino, previene la translocación de microorganismos comensales y agentes patógenos a través del epitelio de la mucosa al hacer más lenta la unión de estos y segregar espacialmente la microbiota del epitelio (Figura 11). Además, la SIgA puede impulsar la agregación de patógenos a través de

la aglutinación o puede neutralizarlos en el lumen del intestino, lo que resulta en la exclusión inmune de virus y bacterias del epitelio intestinal (Alyeo & Alter, 2021).

El recubrimiento del intestino con estos anticuerpos secretores puede limitar la motilidad de las bacterias a través de la luz intestinal, lo que permite al sistema inmune tomar muestras selectivas para generar inmunidad, al tiempo que excluye la penetración de patógenos en los ganglios linfáticos mesentéricos y en las placas de Peyer. Es importante mencionar que no está claro cómo la SIgA diferencia entre antígenos patógenos y comensales (Alyeo & Alter, 2021).



**Figura 11. Los anticuerpos de la leche materna reconocen y segregan los microorganismos comensales del epitelio intestinal.** A) Los anticuerpos de la leche materna se unen a los microorganismos en el intestino neonatal, segregándolos espacialmente del epitelio intestinal. Estos anticuerpos maternos evitan la penetración de bacterias a través del epitelio, lo que limita la respuesta inmune hacia estas, pero a la vez proporciona señales a las células presentadoras de antígenos para que estas tomen muestras seleccionadas para inducir tolerancia inmunológica. B) En ausencia de anticuerpos maternos, las bacterias pueden penetrar en el epitelio intestinal neonatal, lo que da como resultado la activación de las células T en los ganglios linfáticos mesentéricos y la inducción de una respuesta de anticuerpos dependiente de células T (Tomado de Alyeo & Alter, 2021).

La importancia de la SIgA en la colonización bacteriana se ha demostrado en varios estudios. Se ha visto que, en individuos con deficiencia de IgA, se manifiesta una disbiosis intestinal con una alta proporción de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* que domina el microbioma, que es la misma familia dominante en el microbioma de los bebés pequeños antes de la entrada de la SIgA proveniente de la leche materna. Se pudo observar que los individuos continuaban generando SIgM, que también es capaz de atrapar e impulsar la colonización microbiana, sin embargo, estos anticuerpos se dirigen a un subconjunto amplio y menos específico de microorganismos comensales, lo que resultó en la expansión y colonización desregulada del intestino. Esto nos lleva a la conclusión que la SIgA no sólo protege contra los patógenos en el intestino, sino que también impulsa el desarrollo y mantenimiento de una microbiota saludable (Catanzaro et al., 2019).

#### Tolerancia oral: limitación de la respuesta inmune hacia el microbioma intestinal

Los anticuerpos de la leche materna además de ayudar en el establecimiento de un microbioma intestinal saludable, también desempeñan un papel importante en la prevención del desarrollo de una respuesta inmune hacia las bacterias comensales en el intestino (tolerancia oral). Se ha visto que en bebés alimentados con fórmula infantil y en individuos con deficiencia de IgA existe un incremento en la inflamación intestinal (Fadlallah et al., 2018; Ossa et al., 2018).

La tolerancia oral es la respuesta fisiológica a los antígenos alimentarios y a la microbiota comensal mediante la inducción de un estado específico de ausencia de respuesta inmunológica. Es un mecanismo complejo inducido por la mucosa en donde participan las células T reguladoras que ejercen su función a través de la liberación de citocinas supresoras como IL-10 y TGF $\beta$  y se refiere a la supresión de respuestas proinflamatorias dependientes de Th2 (mediado por IgE), hipersensibilidad de tipo retardado dependiente de Th1 (DTH), síntesis de anticuerpos IgG y reacciones granulocíticas dependientes de Th17 (Brandtzaeg, 2010).

Se sabe que las células TCD4<sup>+</sup> neonatales que forman parte del tejido linfoide permanecen inmaduras durante todo el período posnatal en condiciones homeostáticas, pero maduran y obtienen una función efectora cuando se da una interrupción de la barrera mucosa. La SIgA

materna y las células T reguladoras actúan en conjunto para prevenir la estimulación inmunológica y mantener el fenotipo inmaduro de las células TCD4<sup>+</sup> en el intestino posnatal durante la homeostasis. Esta supresión activa podría contribuir a prevenir la auto reactividad (enfermedad autoinmune), mantener un amplio repertorio de TCR (receptor de linfocitos T) y establecer una homeostasis inmunológica de por vida (Torow et al., 2015).

A continuación, se describirán algunos estudios realizados en modelos de ratones que ayudan a comparar los beneficios de la inmunidad pasiva proporcionada por la leche materna. La expresión de las proteínas de la leche varía considerablemente entre las especies y el desarrollo de la descendencia de los roedores es diferente al del bebé humano. Sin embargo, si una proteína en particular se expresa en niveles altos tanto en el ratón como en los humanos, es probable que un modelo de ratones de una idea de las actividades biológicas fundamentales de esa proteína (Lönnerdal, 2017).

En un estudio realizado con crías de ratones para estudiar los efectos de la SIgA derivada de la leche materna en el desarrollo de la microbiota intestinal y la inmunidad de las crías y en donde se utilizó un esquema de madres con cantidad suficiente de receptor polimérico de inmunoglobulinas y otras con deficiencia de este, se observó que la exposición temprana a SIgA evitó la translocación de bacterias aerobias desde el intestino neonatal hacia los ganglios linfáticos. Además, se determinó que la exposición temprana a SIgA proveniente de la leche dio como resultado un patrón de expresión génica de células epiteliales intestinales en ratones adultos que difería del de los ratones que no recibieron SIgA, incluidos genes asociados con enfermedades inflamatorias intestinales (Rogier et al., 2014).

En otro estudio de ratones se pudo observar que la falta de IgA e IgG en la leche materna resultó en un aumento en la frecuencia de células TCD4<sup>+</sup> efectoras en los ganglios linfáticos mesentéricos y las placas de Peyer de las crías. Además, esta expansión de las células T estuvo acompañada por una elevación de células B provenientes del centro germinal. Del mismo modo, las crías derivadas de madres con deficiencia de IgA y FcRn mostraron una mayor pérdida de peso y niveles más altos de citocinas inflamatorias en comparación con las crías de madres de tipo salvaje (Koch et al., 2016).

Estos estudios apuntan a un papel colaborativo entre las IgG e IgA derivadas de la leche materna en la prevención de la activación inmunológica contra las bacterias comensales; sin embargo, aún no se ha determinado si estas contribuyen a amortiguar la inflamación en los recién nacidos humanos (Atyeo & Alter, 2021).

En cuanto a la parte de las alergias, varios estudios han relacionado la lactancia materna con un menor riesgo de desarrollar alergias, eccema, dermatitis atópica y asma. Los estudios sugieren que la SIgA actúa de manera similar que cuando previene una respuesta inmune hacia la microbiota comensal, es probable que los anticuerpos maternos atrapen y prevengan la diseminación de alérgenos más allá de la barrera epitelial de la mucosa, lo que limita la respuesta inmune a ese alérgeno (Atyeo & Alter, 2021).

Por ejemplo, en un estudio se demostró que la IgA puede prevenir la transcitosis en células epiteliales Caco-2 de la  $\beta$ -lactoglobulina, una proteína del suero de la leche de vaca. Además, los niveles bajos de estos anticuerpos en la leche materna se asociaron con una mayor probabilidad de desarrollar alergia a la leche de vaca en bebés (Atyeo & Alter, 2021; Järvinen et al., 2014).

#### Protección brindada por los anticuerpos de la leche materna contra enfermedades

Variada de estudios han demostrado que la lactancia materna exclusiva durante los primeros meses de vida se asocia con una menor incidencia de enfermedades gastrointestinales hasta el primer año de vida, lo que disminuye hasta 10 veces el riesgo de muerte infantil causada por enfermedades diarreicas (Lamberti et al., 2011).

La leche materna es rica en anticuerpos que se dirigen a patógenos entéricos, estas inmunoglobulinas pueden ser detectadas en las heces de los lactantes amamantados, pero no en los lactantes alimentados con fórmula infantil (Bridgman et al., 2016; Maruyama et al., 2009). Varios estudios apuntan a mecanismos inmunológicos de protección mediados por IgA, por ejemplo, se han relacionado los títulos de IgA con la eficacia de la vacuna contra el rotavirus. Del mismo modo, los títulos de SIgA específicos de patógenos en leche materna también están relacionados con la protección natural contra *Shigella sp* y *Vibrio cholerae* (Durand et al., 2013; Glass et al., 1983; Patel et al., 2013).

Sigue sin estar bien definido si estas respuestas de IgA proporcionan una protección estricta a través de la neutralización o a través de mecanismos inmunológicos adicionales en donde también media la IgA. Sin embargo, es evidente que el recubrimiento intestinal con IgA juega un papel fundamental en evitar la penetración de patógenos, la inflamación y el daño intestinal en la vida temprana (Athey & Alter, 2021).

Los anticuerpos IgM e IgG se encuentran en menor cantidad en la leche humana, sin embargo, tienen participación en la protección contra infecciones en el lactante. Los anticuerpos IgM protegen contra infecciones bacterianas y virales al opsonizar el antígeno para la fijación y destrucción por medio del complemento (Baumgarth et al., 2000; Boes et al., 1998). Los anticuerpos IgA e IgM de alta afinidad transportados por el receptor polimérico de inmunoglobulina pueden inactivar virus (rotavirus y virus de la influenza) dentro de las células epiteliales y llevar estos patógenos y sus productos de regreso al lumen intestinal, evitando así el daño citolítico al epitelio (Johansen & Brandtzaeg, 2004; Quitadamo et al., 2021).

La IgG es la principal inmunoglobulina que se encuentra en el suero y está asociada con la inmunidad a largo plazo. Se transfiere principalmente a través de la placenta de la madre al feto, aunque también se produce en la glándula mamaria y se detecta en la mayoría de las muestras de calostro de las madres. En la leche materna está presente en una pequeña porción, sin embargo, juega un papel antiinflamatorio por unión directa, opsonización y aglutinación de patógenos (Thai & Gregory, 2020).

Varios estudios demuestran el papel de los anticuerpos presentes en la leche materna en la disminución de las infecciones en los lactantes. Por ejemplo, un estudio realizado *in vitro* para investigar los efectos inhibitorios de los anticuerpos en leche materna sobre la multiplicación de la cepa de la vacuna contra el rotavirus (Rotarix) en un sistema de cultivo celular MA104 (Kazimbaya et al., 2020).

En este análisis se recolectó muestras de leche humana de madres antes de que sus bebés recibieran la vacuna viva contra el rotavirus. Para cada muestra, se aisló leche entera, IgA purificada, IgG purificada y leche con deficiencia de IgA/IgG. Las células MA104 inoculadas con la vacuna viva contra el rotavirus se expusieron a diferentes diluciones de leche entera,

IgA purificada, IgG purificada y leche con deficiencia de IgA/IgG. Se pudo observar que la leche materna entera y las fracciones de IgG e IgA purificadas de la leche inhibieron la replicación viral, mientras que la leche materna sin IgA e IgG no mostró ninguna actividad inhibidora *in vitro*, lo que sugiere que estas inmunoglobulinas de la leche pueden tener propiedades inhibitorias funcionales y proteger contra las infecciones por rotavirus en bebés (Kazimbaya et al., 2020).

#### 2.2.f Osteopontina (OPN)

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína presente en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales como orina, sangre y leche, aunque sus concentraciones más altas se encuentran en la leche materna. Posee múltiples funciones como remodelación de tejidos, formación ósea, actividades inmunomoduladoras, así como unión, migración, proliferación y diferenciación celular (Aksan et al., 2021; Christensen et al., 2020; Jiang & Lönnnerdal, 2019).

En cuanto a su presencia en leche materna, no está claro si son los macrófagos o las células epiteliales del tejido mamario las que producen la mayor parte de la OPN en la leche. Sin embargo, existe evidencia de que la presencia de células epiteliales productoras de OPN en la leche materna durante la lactancia activa influye en el desarrollo del sistema inmunológico en los recién nacidos (Demmelmair et al., 2017).

La OPN contiene dominios de unión RGD (Arg-Gly-Asp) a integrinas de la superficie celular, así como afinidad por el receptor CD44. Esta ejerce sus funciones uniéndose a sus receptores en las membranas celulares para iniciar cascadas de señalización (Jiang & Lönnnerdal, 2019). Esta proteína experimenta varios tipos de modificación postraduccional por medio de fosforilación, glicosilación y proteólisis en los diferentes tejidos, órganos y fluidos corporales, por lo que puede adquirir una función específica del sitio. La leche materna, la sangre del cordón umbilical y el plasma infantil contienen grandes cantidades de OPN, lo que sugiere que puede desempeñar un papel importante en la lactogénesis y en el desarrollo del sistema inmunológico y nervioso, así como la programación de funciones vitales para la salud a largo plazo del recién nacido (Aksan et al., 2021).

Varios autores mencionan que el papel biológico de la OPN, así como los mecanismos de participación directa y/o indirecta en las funciones antes mencionadas no se comprenden completamente (Aksan et al., 2021; Christensen et al., 2020; Jiang & Lönnerdal, 2019), por lo que se necesitan más estudios que los describan con más detalle.

La OPN se encuentra presente en leche humana y bovina en 2 formas: como proteína completa intacta y como fragmentos N-terminales generados por proteólisis (Christensen et al., 2020). Estudios *in vitro* han demostrado que la OPN de la leche materna es parcialmente resistente a la proteólisis en el tracto gastrointestinal del bebé, lo que muestra su papel potencial como componente bioactivo (Chatterton et al., 2004).

En la leche materna se encuentran altas concentraciones (138 mg/ml) de osteopontina en su isoforma completa (OPNa), lo que sugiere su importancia en el desarrollo del bebé. Las concentraciones de OPN en la leche bovina son más bajas (18 mg/ml). Sin embargo, las proteínas comparten una homología de secuencia del 61 % y ambas contienen sitios proteolíticos y de unión a integrinas similares, por lo que estudios realizados con OPN bovina sirven de referencia para estudiar sus propiedades (Morrin et al., 2021).

En diversos estudios se ha demostrado el papel de la OPN en la defensa contra infecciones. Por ejemplo, en uno realizado *in vitro* en donde se demostró que la OPN se une de manera específica a todos los serotipos conocidos de las especies bacterianas *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* y opsoniza estas bacterias para su fagocitosis. Además, se identificó la integrina  $\alpha\beta 2$  (CD11c/CD18) que se expresa en la superficie celular de los monocitos como un receptor de OPN y que es requerida para la fagocitosis mediada por esta proteína, aclarando de esta manera un mecanismo importante en la inmunidad innata (Schack et al., 2009).

También se ha visto que la suplementación con OPN influye en el perfil de expresión génica, como se observó en un estudio realizado con monos rhesus recién nacidos en donde se evaluó el impacto de la suplementación de la fórmula infantil con OPN bovina en el crecimiento, composición corporal y en el transcriptoma yeyunal (Donovan et al., 2014).

Los monos recién nacidos fueron asignados aleatoriamente para ser amamantados, recibir fórmula infantil estándar o fórmula infantil suplementada con OPN bovina (125 mg/l) durante 3 meses. El ARNm yeyunal se extrajo y se sometió a análisis por la técnica de microarreglos. Se determinó que el número de genes que diferían entre los grupos alimentados con leche materna y alimentados con fórmula suplementada con OPN fue menor (217 genes) en comparación con el grupo alimentado con fórmula infantil estándar (1214 genes). El grupo suplementado con OPN mostró una expresión génica diferencial en genes implicados en la supervivencia, proliferación, movimiento y comunicación celular más cercana a la del grupo que había sido amamantado (Donovan et al., 2014).

Para poder evaluar la bioactividad de las proteínas de la leche humana en animales de experimentación se requiere una mayor cantidad de proteína, que no siempre está disponible comercialmente, por lo tanto, dichos modelos se han utilizado de forma limitada. Una forma novedosa de explorar la bioactividad de una proteína láctea específica es utilizar modelos de ratones knockout (modificados genéticamente para que uno o más de sus genes estén inactivados) (Lönnerdal, 2017). Un ejemplo de esto es un estudio realizado por este mismo autor, en donde utilizó un modelo de ratón knockout para evaluar la bioactividad de la OPN. Se menciona que tanto en la leche humana como en la de ratones se encuentran altas concentraciones de OPN y sus estructuras son similares. En este estudio las crías de ratón de tipo salvaje fueron amamantadas por madres knockout sin osteopontina detectable en la leche o por madres de tipo salvaje. Se logra demostrar que la OPN es importante para el desarrollo del cerebro y la función cognitiva, inmunidad y desarrollo intestinal (Jiang & Lönnerdal, 2016; Lönnerdal, 2017).

La osteopontina desempeña un papel importante en la protección de la mucosa intestinal, ya que puede modular la expresión de ocludina, una proteína esencial en la regulación de la integridad de las uniones estrechas (Woo et al., 2019).

En un estudio realizado con ratones knockout para OPN y ratones de tipo salvaje, se evaluó los signos clínicos y la histopatología de la colitis aguda inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS). Además, se examinaron los niveles de expresión de ocludina y ZO-1 mediante inmunofluorescencia. Para el análisis *in vitro*, se utilizó una monocapa de células Caco-2 suprimida por OPN. Se observó que la deficiencia de OPN dio como resultado un índice

elevado de actividad de la enfermedad, un colon más corto y signos histológicos agravados en ratones con colitis aguda en comparación con los ratones salvajes. La deficiencia de OPN condujo a una expresión reducida de la forma fosforilada de ocludina en la mucosa colónica de los ratones, lo que indica que la OPN tiene un papel importante para la formación eficaz de uniones estrechas (Woo et al., 2019).

La proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales son fundamentales en la defensa contra patógenos. Por lo tanto, la modulación de la expresión génica en el epitelio intestinal inducida por la OPN descrita anteriormente puede indicar una susceptibilidad reducida a la invasión e infección por microorganismos patógenos (Morrin et al., 2021).

La OPN también puede contribuir a la defensa contra patógenos al alterar las respuestas inmunológicas. Por ejemplo, se sabe que el gen de OPN se expresa en las células T cooperadoras en el inicio de una infección bacteriana y su interacción con macrófagos induce una respuesta inflamatoria de tipo Th1 que es requerida para la protección inmune contra la mayoría de patógenos intracelulares (Ashkar et al., 2000).

Se ha observado que en ratones deficientes en la expresión del gen OPN tienen inmunidad de tipo Th1 gravemente afectada contra infecciones virales y bacterianas, la producción de IL-12 e interferón- $\gamma$  se encuentra disminuida, mientras que la IL-10 (encargada de inhibir la respuesta) se encuentra aumentada. Se pudo observar que la interacción dependiente de fosforilación entre la porción amino-terminal de OPN y su receptor de integrina estimuló la expresión de IL-12 en macrófagos, mientras que la interacción independiente de fosforilación con CD44 inhibió la expresión de IL-10. Estos hallazgos indican que la OPN es una proteína clave que prepara el escenario para respuestas inmunológicas de tipo Th1 eficientes a través de la regulación diferencial de la expresión de las citocinas IL-12 e IL-10 en macrófagos (Ashkar et al., 2000).

Por otra parte, en un ensayo controlado aleatorizado realizado con bebés humanos de 1, 4 y 6 meses se comparó los grupos alimentados con fórmula infantil con un grupo de referencia alimentado con leche materna (West et al., 2017).

El estudio incluía 3 grupos alimentados con fórmula infantil: fórmula estándar, fórmula suplementada con OPN de leche bovina en una concentración de 65 mg/l (representa el 50% de la concentración de OPN en leche materna) y fórmula suplementada con OPN en una concentración de 130mg/l. Se examinó la frecuencia y composición de las células inmunes de sangre periférica de los bebés mediante citometría de flujo. Se observó que la fórmula infantil suplementada con OPN en concentraciones cercanas a la leche materna (130mg/l) aumentó la proporción de células T circulantes en comparación con la fórmula estándar y la suplementada con 65mg/ml de OPN. Lo que sugiere que la OPN puede influir favorablemente en la composición inmune durante la infancia y los efectos parecen depender de la dosis (West et al., 2017).

Se ha evidenciado que los lactantes alimentados con fórmula infantil suplementada con OPN tienen concentraciones séricas más bajas de citocinas proinflamatorias y su perfil de citocinas es más similar al de bebés alimentados con leche materna, en comparación con aquellos alimentados con fórmula estándar (Lonnerdal et al., 2016).

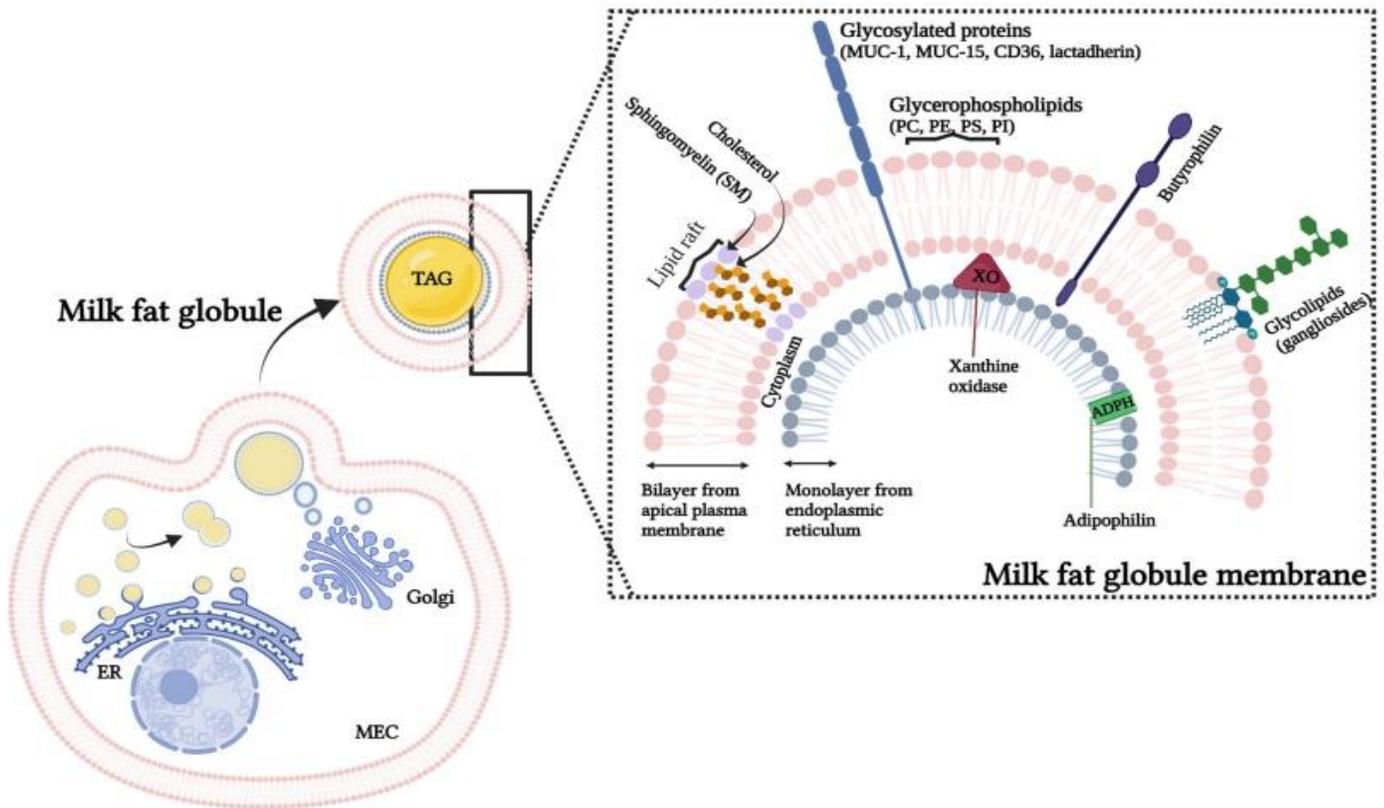
Como se ha podido observar, existe evidencia que ha demostrado que los niveles de OPN son altos en leche materna y que posee funciones inmunológicas. Sin embargo, los estudios que han examinado la estructura y función de la OPN en la leche materna son escasos y pocos exhaustivos, por lo que se necesita ampliar el conocimiento para futuros usos (Aksan et al., 2021).

#### 2.2.g Membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM) y proteínas asociadas

La grasa es el componente de la leche humana que proporciona la mayor parte de energía y comprende una mezcla compleja de diferentes clases de lípidos. Para permitir que esta grasa (incluyendo triglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol) permanezca dentro de la leche como una emulsión natural, los lípidos que se producen dentro de las células secretoras de la glándula mamaria son encapsulados por la membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM, del inglés milk fat globule membrane) (Thum et al., 2022).

#### Formación de la MFGM

La MFGM rodea la vesícula en la que se administra grasa en la leche (el MFG o glóbulo de grasa de la leche). En el retículo endoplasmático dentro de las células epiteliales alveolares de la glándula mamaria se crea esta vesícula de fosfolípidos citosólicos, que se carga con triacilglicéridos (TAG). Esta vesícula citosólica rica en TAG viaja luego a la membrana plasmática secretora. Proteínas como la xantina deshidrogenasa (XDH), la adipofilina (ADPH) y la butirofilina (BTN) ayudan en el movimiento y se unen a la membrana. Una vez allí, la vesícula citosólica llena de TAG brota con la bicapa de fosfolípidos hacia el líquido secretor, recogiendo en el camino una multitud de proteínas asociadas con la membrana plasmática de la célula mamaria (figura 12) (Brink & Lönnerdal, 2020; Hernell et al., 2016; Lee et al., 2018; Mohamed et al., 2022; Wang et al., 2022).



**Figura 12.** Representación del origen y estructura de los glóbulos de grasa de la leche. Los MFG son secretados por la célula del epitelio mamario (MEC), con componentes del retículo endoplasmático (ER), el citoplasma y la membrana celular. EL MFG secretado contiene un núcleo de triacilglicerol (TAG) y una estructura de 3 capas: la membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM). La MFGM en detalle, muestra la segregación lateral de esfingomielina y glicolípidos (gangliósidos) rodeados por los glicerofosfolípidos. También se presentan imágenes ilustrativas de algunas de las principales proteínas de MFGM (que incluyen mucinas MUC-1, MUC15), lactodherina, adipofilina (ADPH), xantina oxidasa (XO) y butirofilina). PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol (Tomado de Thum et al., 2022)

### Funciones generales de la MFGM

La creciente evidencia sugiere que la estructura del glóbulo de grasa de la leche y los componentes bioactivos que integran la MFGM, pueden beneficiar al bebé al contribuir en la maduración estructural y funcional del intestino a través del suministro de nutrientes esenciales y/o la regulación de varios eventos celulares durante el crecimiento y educación inmunológica (Brink & Lönnerdal, 2020; Lee, Padhi et al., 2018). Además, participa en la síntesis de proteínas, transducción de señales, transporte, comunicación celular, así como el metabolismo de producción de energía (Thum et al., 2022).

Los péptidos antimicrobianos y los restos de carbohidratos presentes en la MFGM podrían tener un papel fundamental en la composición de las poblaciones microbianas intestinales, lo que a su vez juega un papel protector contra enfermedades inmunes e inflamatorias en las etapas iniciales de la vida (Lee et al., 2018).

La MFGM posee actividad antimicrobiana que protege contra el desarrollo de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, un ensayo clínico aleatorizado doble ciego mostró que los bebés de 2 a 6 meses de edad alimentados con una fórmula infantil experimental suplementada con MFGM bovina, presentaron menos infecciones de otitis media aguda y menos fiebre que los que recibieron una fórmula infantil control (Timby et al., 2015).

Por otra parte, se ha visto que los componentes de la MFGM pueden regular los eventos celulares para permitir la maduración del sistema inmunológico de la mucosa, mejorando de esta forma la salud infantil (Lee, Padhi et al., 2018; Wang et al., 2022). La maduración de la inmunidad adaptativa implica la exposición a un antígeno, seguida de la diferenciación de células T en respuesta a los antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos.

La MFGM humana contiene HLAII (antígeno leucocitario humano II) que constituye un complejo presentador de antígenos típicamente expresado en la superficie de las CPA, que puede derivar de HLA-DR (subgrupo del MHC II) en el epitelio de la glándula mamaria (Lee, Padhi et al., 2018; Liao et al., 2011).

Estudios sugieren que el HLAII en la MFGM puede estar involucrado en la presentación de antígenos encontrados por la madre a linfocitos TCD4+ en el intestino del bebé, apoyando de esta manera la educación inmunológica durante los primeros años de vida cuando se está estableciendo la tolerancia oral (Lee, Padhi et al., 2018).

Es importante señalar que algunos estudios y observaciones incluidos en esta sección no se realizaron en humanos sino en otras especies de mamíferos. Sin embargo, es probable que ocurran fenómenos similares en la MFGM humana. Aún no está claro si esos cambios tienen implicaciones para el lactante (Thum et al., 2022).

Por otra parte, los genes que regulan la función de la MFGM están altamente conservados entre las especies. El nivel de fosfolípidos y sus componentes en la leche bovina y humana son en su mayoría comparables, además la composición proteica es similar en ambas. Con base a esto, la MFGM de origen bovino puede considerarse apropiada si se agrega a las fórmulas lácteas industriales para lactantes y puede servir de referencia para analizar los beneficios de la MFGM humana (Mohamed et al., 2022).

### Composición de la MFGM y funciones asociadas

#### Lípidos

La MFGM que rodea el núcleo de TAG es una mezcla compleja de 60% proteínas y 40% lípidos. Los principales componentes son los fosfolípidos de membrana como los glicerofosfolípidos (fosfolípidos a base de glicerol), que incluye: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI). Otro componente que pertenece a los fosfolípidos de membrana son los esfingolípidos, en particular la esfingomielina (SM). Otro componente son los glicolípidos o glicoesfingolípidos como los cerebrosidos y los gangliósidos que están presentes en menor cantidad (Lee, Padhi et al., 2018; Quitadamo et al., 2021).

Los esfingolípidos como la esfingomielina son digeridos por las enzimas del borde en cepillo expresadas al nacer para originar productos digestivos como: ceramida, esfingosina, esfingosina-1-fosfato (S1P) y ceramida-1-fosfato. Estos productos metabólicos intervienen en las vías de señalización intracelular que están involucradas en procesos como el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y migración de células inmunes en la mucosa neonatal que facilitan la maduración enzimática y morfológica del intestino (Lee, Padhi et al., 2018).

La esfingomielina es el esfingolípido predominante en la MFGM y está presente en mayor cantidad en la leche humana en comparación con la leche de otras especies, muestra actividad antitumoral y puede influir en el metabolismo del colesterol, además posee actividad antiinfecciosa (Lee, Padhi et al., 2018; Quitadamo et al., 2021).

Los gangliósidos son componentes integrales de las membranas celulares, estos disponen de residuos de oligosacáridos que se extienden desde la superficie celular y sirven como marcadores de superficie en la comunicación intercelular. Asimismo, pueden modificar la membrana del borde en cepillo del tracto gastrointestinal (Lee, Padhi et al., 2018). Estos poseen residuos de ácido siálico y se clasifican según el número de residuos de ácido siálico en el esqueleto molecular, el número de residuos adheridos al resto de carbohidrato y la ruta biosintética de donde se derivan. La leche humana contiene una concentración mucho mayor de gangliósidos que la leche bovina (Lee, Padhi et al., 2018).

Los gangliósidos de la MFGM participan en múltiples aspectos relacionados al sistema inmunológico de la mucosa. Se ha observado que los gangliósidos provenientes de la dieta modulan la producción intestinal de IgA y citocinas, así como la activación de linfocitos. También se ha visto que los gangliósidos GM3 y GD3 inhiben las funciones de las células dendríticas, lo que sugiere que además de promover la defensa contra antígenos agresivos, pueden promover la tolerancia contra antígenos que no lo son, lo cual es importante durante las primeras etapas de la vida (Lee, Padhi et al., 2018; Rueda, 2007; Wang et al., 2022).

Los niveles de GD3 son más altos en el calostro y tiene una actividad inhibitoria superior sobre las funciones de las células dendríticas en comparación con el GM3, lo que indica que la modulación inmune dada por gangliósidos es más prominente durante la primera infancia.

Esto sugiere que puede existir una relación entre los cambios en la composición de la leche materna y la maduración intestinal del lactante durante el transcurso de la lactancia (Lee, Padhi et al., 2018; Rueda, 2007; Wang et al., 2022).

En un estudio *ex vivo*, se determinó que la exposición previa de tejido intestinal infantil a gangliósidos redujo la necrosis intestinal y las señales proinflamatorias en respuesta a LPS, lo que implica una reestructuración funcional *in vivo* de los enterocitos (Schnabl et al., 2009).

Los gangliósidos también tienen la capacidad de reducir el riesgo de infección. Se ha demostrado que los gangliósidos extraídos de leche humana inhiben la producción de la enterotoxina de *Escherichia coli in vitro*, así como la toxina del cólera *in vivo* en una prueba de asa intestinal de conejo (Brink & Lönnerdal, 2020). También se ha observado que los gangliósidos inhiben la adhesión de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas y enteropatógenas en modelos de células Caco-2 *in vitro*. En este estudio, los gangliósidos GM3 y GM1 son los más efectivos en la inhibición. Se cree que logran evitar la adhesión por medio del mecanismo de receptor señuelo (Brink & Lönnerdal, 2020).

En un estudio realizado con recién nacidos humanos prematuros, se vio que los lactantes alimentados con una fórmula suplementada con gangliósidos bovinos tuvieron recuentos fecales de *Escherichia coli* disminuidos y un aumento de especies del género *Bifidobacterium* en comparación con aquellos alimentados con una fórmula estándar, por lo que también se puede ver la influencia de los gangliósidos en el aumento de la microbiota beneficiosa (Lee, Padhi et al., 2018).

Se ha visto que los gangliósidos expresados en macrófagos murinos funcionan como un sitio de unión para el norovirus murino tipo 1 (Taube et al., 2009). De manera similar, se ha encontrado que el ácido siálico expresado en células Caco-2 facilita la adhesión de *Salmonella typhi* a las monocapas celulares (Sakarya & Öncü, 2003). En estos estudios, la unión de bacterias o virus se vio facilitada por la expresión de fracciones de ácido siálico en la célula hospedadora, traducir estos resultados a los gangliósidos presentes en la leche que también presentan residuos de ácido siálico, puede dar una idea del mecanismo de acción y fortalece aún más la evidencia de protección a través del mecanismo de receptor señuelo (Brink & Lönnerdal, 2020).

## Proteínas

Las proteínas que se localizan dentro de la MFGM representan del 1-4% de la fracción total de proteína en la leche, estas se han explorado ampliamente mediante proteómica. Se han identificado gran variedad de proteínas en la leche humana algunas de las cuales han sido bien caracterizadas e incluyen la butirofilina glicosilada, mucinas, xantina oxidorreductasa, lactoadherina, proteínas CD, adipofilina no glicosilada y proteínas de unión a ácidos grasos. Estas proteínas son las principales observadas en todas las especies de mamíferos, lo que sugiere importantes funciones biológicas (Brink & Lönnerdal, 2020; Cavaletto et al., 2022; Lee, Padhi et al., 2018; Thum et al., 2022; Wang et al., 2022).

Además de las proteínas mencionadas anteriormente se ha encontrado en la MFGM humana por medio de estudios proteómicos proteínas como  $\alpha$ -lactoalbúmina, lisozima,  $\beta$ -caseína, clusterina, lactoferrina, inmunoglobulinas (por ejemplo, cadena  $\alpha$  de IgA), tenascina, apolipoproteínas y ácido graso sintasa. Los BTN son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y el miembro A1 de la subfamilia 1 de butirofilina (BTN1A1) es el que se ha demostrado que se asocia con la MFGM humana. Además, existen otras proteínas con menor abundancia, que incluyen las enzimas glicosiladas anhidrasa carbónica, fosfatasa alcalina de la leche y osteopontina (Lee, Padhi et al., 2018).

Otra clase de proteínas que se pueden encontrar de manera abundante en la MFGM humana son las mucinas (MUC), donde la mucina 1 (MUC1) y la MUC4 son las más abundantes (Brink & Lönnerdal, 2020; Cavaletto et al., 2022; Lee, Padhi et al., 2018; Thum et al., 2022; Wang et al., 2022). Estas proteínas tienen dominios extracelulares altamente glicosilados, que las protege de la degradación por la pepsina y la desnaturalización por el pH bajo del estómago del bebé, por lo que mantienen su bioactividad funcional en el intestino y podrían actuar como señuelo para patógenos (Brink & Lönnerdal, 2020; Lee Padhi, et al., 2018).

Se ha demostrado que la mucina inhibe la invasión de bacterias patógenas entéricas comunes, como *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* SL 1344, lo que explica el menor riesgo de infección en bebés alimentados con leche materna en comparación con aquellos alimentados con fórmula láctea industrial (Liu et al., 2012).

Las proteínas en la MFGM se han asociado con múltiples beneficios para la salud, especialmente en la defensa inmunológica. Se han observado fluctuaciones temporales en las proteínas de la MFGM relacionadas con el sistema inmune durante desafíos como una infección bacteriana. Por ejemplo, se ha visto en ovejas lactantes que *Mycoplasma agalactiae* (una bacteria causante de mastitis) inicia una respuesta inmunológica que conduce a un aumento de proteínas implicadas en la defensa del hospedador, inflamación y estrés oxidativo, mientras se disminuye la síntesis de proteínas implicadas en el metabolismo y secreción de la grasa de la leche (Addis et al., 2011).

Algunas proteínas de la MFGM pueden participar en la modulación de las propiedades de las células T, regulador clave del sistema inmune. Se ha observado que la butirofilina (BTN) es un regulador negativo de la proliferación y actividad de las células T. Se ha visto que cuando las células TCD4<sup>+</sup> de ratón son activadas mediante anticuerpos anti-CD3 inmovilizados en presencia de las proteínas de fusión Fc recombinantes BTN1A1 y BTN2A2, se inhibe la proliferación de células T, así como la síntesis de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Smith et al., 2010). Por lo tanto, la butirofilina en el epitelio de la glándula mamaria puede controlar la función de las células T maternas y en la MFGM la función de las células T en la leche. También puede afectar las células T neonatales (Lee, Padhi et al., 2018).

La lactoadherina es otra proteína que forma parte de la MFGM. También es conocida como MFG-E8; posee efectos antimicrobianos y antivirales y juega un papel importante en la defensa inmunológica (Thai & Gregory, 2020).

La lactoadherina se considera una glicoproteína multifuncional que está involucrada en la regulación de diversos procesos biológicos y fisiológicos, como la angiogénesis, la hemostasia, la fagocitosis y la remodelación de tejidos. Las actividades endógenas intrínsecas incluyen la cicatrización de heridas en la mucosa y la atenuación de la inflamación intestinal que se ha podido observar de manera *in vivo* y *ex vivo* (Quitadamo et al., 2021). Se ha demostrado que la administración de lactoadherina restaura la migración de enterocitos en ratones sépticos, lo que reafirma el beneficio de esta en el tratamiento de lesiones intestinales (Bu et al., 2007).

Esta glicoproteína también induce la liberación de IL-10 y TGF- $\beta$  de las células T reguladoras y promueve el desarrollo intestinal de las células dendríticas. Además, mejora la capacidad de los macrófagos para fagocitar células apoptóticas (Lee, Padhi et al., 2018; Quitadamo et al., 2021). Estimula específicamente una cascada de señalización que bloquea el factor de transcripción NF- $\kappa$ B a través del bloqueo de TLR4, lo que resulta en una disminución de la inflamación (Thai & Gregory, 2020).

La lactoadherina activa un supresor de la señalización por citoquinas, apagando directamente la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS. De hecho, se ha informado que la lactoadherina recombinante puede atenuar la apoptosis inducida por sepsis (Quitadamo et al., 2021).

Por otra parte, se ha observado una correlación positiva entre las concentraciones de lactoadherina en la leche materna y los efectos protectores contra la infección por rotavirus en lactantes, lo cual es independiente del nivel de IgA secretora y otros componentes de la leche como butirofilina y mucina (Lee, Padhi et al., 2018). Esta observación está respaldada por estudios en donde se utilizan modelos de cultivo celular que muestran que la lactoadherina humana limita la infectividad del rotavirus en células Caco-2 (Kvistgaard et al., 2004).

Otra proteína de la MFGM que se asocia en menor medida con el desarrollo del sistema inmunológico es la fosfatasa alcalina de la leche, la cual puede contribuir a la protección contra la inflamación en el intestino. Aunque el papel de la fosfatasa en la MFGM no está del todo claro, se ha visto que esta enzima es producida endógenamente por los enterocitos y puede desfosforilar moléculas proinflamatorias como el LPS, e inhibir la señalización de NF $\kappa$ B mediada por receptores tipo toll y la inflamación posterior en el intestino (Lallès, 2016).

La osteopontina (OPN), es otra proteína que forma parte de la MFGM en menor cantidad y participa en el desarrollo del sistema inmunológico innato y adaptativo de los neonatos, como se explicó anteriormente en este capítulo (Lee, Padhi et al., 2018).

La xantina oxidoreductasa (XOR), es una importante enzima oxidativa que genera especies reactivas del oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, así como

especies reactivas del nitrógeno, las cuales desempeñan un papel en la defensa antimicrobiana del tracto gastrointestinal (Lee, Padhi et al., 2018).

La actividad enzimática de XOR en la leche humana alcanza su punto máximo durante las primeras semanas de lactancia, probablemente como una medida de protección para el intestino inmaduro del bebé en esta etapa. Esta enzima se encuentra en la parte interna de la MFGM, y su liberación y activación en la fase oral proporciona la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos (Lee, Padhi et al., 2018). Este hecho se puede corroborar con un estudio en donde se analizó la microbiota oral en bebés menores de 2 meses que recibieron fórmula suplementada con MFGM de origen bovino, y se pudo determinar que *Moraxella catarrhalis*, una de las bacterias más comunes asociadas a la otitis, fue menos frecuente en los hisopados orales de los bebés que recibieron fórmula suplementada con MFGM en comparación con los lactantes alimentados con fórmula infantil estándar (Timby et al., 2017).

Estos datos proporcionan evidencia del efecto de apoyo de la MFGM en el sistema inmunológico de la mucosa, además demuestran que es un componente de la leche clave en la mejora de la defensa intestinal durante los primeros años de vida (Lee et al., 2018).

Las fuentes comerciales de origen bovino de MFGM han llegado recientemente al mercado como ingredientes novedosos alimentarios y se han agregado a varios productos, entre ellos las fórmulas lácteas infantiles. Contienen ingredientes enriquecidos con MFGM y extracto de fosfolípidos. Los ingredientes enriquecidos con MFGM se obtienen mediante una combinación de procesos físicos, mientras que la mayoría de los extractos de fosfolípidos se obtienen mediante extracción con solventes a partir de fracciones enriquecidas con MFGM (Morrin et al., 2021).

### **2.3 Lípidos del glóbulo de grasa de la leche**

Los lípidos presentes en la leche se clasifican en grupos de acuerdo con su solubilidad en disolventes apolares y orgánicos, clasificándose como lípidos neutros: triglicéridos (TAG), diglicéridos (DAG) y monoglicéridos (MAG), lípidos polares: fosfolípidos y glicolípidos, y lípidos misceláneos o insaponificables: esteroides, carotenoides y vitaminas. En la leche materna, los lípidos están presentes como glóbulos de grasa, constituidos principalmente por

TAG rodeados por una membrana estructural compuesta por fosfolípidos, colesterol, proteínas y glicoproteínas (La MFGM estudiada anteriormente) (Morrin et al., 2021).

Estos glóbulos de grasa se componen principalmente de triacilglicéridos, además de los ácidos grasos necesarios para el crecimiento y el desarrollo. La composición del glóbulo de grasa varía considerablemente entre los individuos y es dinámica a lo largo de la lactancia. Estas variaciones se dan por factores maternos como la dieta, el medio ambiente, la genética materna y la composición corporal, así como las necesidades cambiantes del bebé durante el período de lactancia (Lee, Padhi et al., 2018).

Los lípidos de la leche materna son fundamentales para el crecimiento y la salud de los bebés y constituyen la fracción más grande de la ingesta total de energía durante la infancia, proporcionando aproximadamente el 50% de la energía de la leche apoyando el desarrollo y la maduración del sistema nervioso central, las funciones inmunológicas y respuestas inflamatorias (Perrella et al., 2021).

Se describirán las funciones de los lípidos que constituyen el glóbulo de grasa propiamente, que no fueron abarcados en el estudio de los lípidos constituyentes de la MFGM.

### Lípidos Neutros

#### Triglicéridos (TAG)

La fracción grasa de la leche materna comprende 98% de triglicéridos que consisten predominantemente en ácidos grasos saturados (SFA por saturated fatty acids), seguidos de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA por monounsaturated fatty acids) y aproximadamente el 20% de los ácidos grasos en la leche son ácidos grasos poliinsaturados omega (n)-3 o n-6 (PUFA por polyunsaturated fatty acids). Estos incluyen PUFA de cadena más larga (longitud de cadena de carbono > 20, LCPUFA) de la familia n-6 y n-3, como el ácido araquidónico (C20:4n-6, ARA) y el ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA), así como sus respectivos precursores C18: el ácido linoleico (C18:2n-6, LA) y el ácido alfa-linolénico (C18:3n-3, ALA) que pueden convertirse en LCPUFA después de la ingestión (Kim & Yi, 2020; Morrin et al., 2021).

La leche materna contiene una alta proporción de PUFAs omega-3 capaces de reducir la producción de citocinas inflamatorias (ver capítulo 1) (Thai & Gregory, 2020).

Se ha visto en estudios realizados en ratones que la suplementación de leche de fórmula con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 disminuye la incidencia de enterocolitis necrotizante y la inflamación intestinal a través de la disminución de la activación del receptor TLR4 (Caplan et al., 2001; Lu et al., 2007; Quitadamo et al., 2021).

Por otra parte, los mediadores especializados pro-resolutivos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (SPMs), resuelven específicamente la inflamación al detener la migración de polimorfonucleares y protegen contra afecciones inflamatorias crónicas, como colitis, neuroinflamación y artritis. Los PUFAs omega-3 también tienen un papel importante en el aumento de bacterias beneficiosas como especies del género *Lactobacillus* y especies del género *Bifidobacterium*. Además, los LCPUFA como el DHA y los aminoácidos son esenciales como inmunomoduladores ya que regulan la producción de citoquinas inflamatorias, leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos (Quitadamo et al., 2021; Zheng et al., 2022).

### Ácido docosahexaenoico (DHA)

El ácido docosahexaenoico es uno de los principales PUFA omega-3 y está clasificado como un ácido graso omega-3 esencial en la nutrición humana. El DHA es un ingrediente clave para una función cognitiva óptima, el desarrollo y la salud general en la vida infantil temprana. Sin embargo, el cuerpo humano no lo sintetiza, sino que se adquiere a través de la dieta. La leche materna es una fuente externa de DHA para los bebés durante los primeros meses de vida, siempre que la madre que amamanta logre una ingesta diaria mínima de 200 mg para un suministro de 100 mg de DHA al día para el bebé (Morrin et al., 2021).

Existe un número limitado de estudios que detallan la acción mecanicista de la actividad antimicrobiana del DHA. Además, el DHA afecta directamente la membrana celular bacteriana (Morrin et al., 2021). En un estudio se demostró el efecto inhibitor del DHA comercial purificado en el crecimiento tanto *in vivo* como *in vitro* de *Helicobacter pylori*. La incubación de *Helicobacter pylori* con DHA redujo los recuentos de UFC viables de manera

dosis-dependiente. Además, se observó que cuando se suministró DHA a ratones infectados con *Helicobacter pylori* exhibieron una colonización reducida de esta, además mostraron niveles significativamente más bajos de prostaglandina E2 (PGE2) en suero y otras células inmunes asociadas con la inflamación de la mucosa gástrica (Correia et al., 2012).

En un estudio realizado con cepas de *Helicobacter pylori* incubadas con DHA se pudo observar por medio de microscopía electrónica de barrido que hubo un cambio en la morfología de la forma bacilar normal de *Helicobacter pylori* a una forma cocoide. Esta morfología se asocia con la pérdida o reducción de la viabilidad celular y puede indicar una interferencia del DHA con el peptidoglicano de la pared celular bacteriana (Chaput et al., 2007).

También se ha visto que el DHA inhibe el crecimiento de *Acinetobacter baumannii* a través de su incorporación a la membrana celular, lo que afecta la permeabilidad y la integridad de esta (Jiang et al., 2019). En esta misma línea, se ha observado que la acción sinérgica entre la lisozima purificada de la leche humana y el DHA comercial inhibe la actividad metabólica de *Pseudomonas aeruginosa*. Se demostró que el DHA aumenta la alteración de la membrana celular bacteriana mediada por lisozima, lo que permite una mayor acumulación de este ácido graso en la membrana y finalmente lleva a la muerte celular de *Pseudomonas aeruginosa* (Martinez et al., 2009).

El DHA posee actividad antimicrobiana contra varios patógenos orales cuando son incubados *in vitro* con este ácido graso, aunque el modo de acción no está claro. Entre ellos se encuentran: *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* (Huang & Ebersole, 2010). Además, el DHA comercial inhibe *in vitro* el crecimiento de patógenos Gram positivos como *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. También inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas específicamente *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* (Shin et al., 2007).

#### Monoglicéridos:

### Monolaurato de glicerol (GML)

Los ácidos grasos y los monoglicéridos contienen propiedades bacteriostáticas y bactericidas contra una amplia gama de bacterias. En particular, el monolaurato de glicerol (dodecanoato de 2,3-dihidroxiopropilo) es un ácido láurico de 12 carbonos éster de glicerol comúnmente utilizado como emulsionante y conservante en la industria alimentaria y cosmética. Además, posee una potente actividad antimicrobiana y antiviral (Morrin et al., 2021). Se ha visto que la concentración de GML en la leche humana entera pasteurizada es de 3000 µg/ml en comparación con la leche bovina que contiene 150 µg / ml y la ausencia en las fórmulas para lactantes (Schlievert et al., 2019).

El GML está asociado con potentes propiedades antimicrobianas y antivirales y puede servir como un ingrediente clave en la leche materna en la formación de una microbiota beneficiosa, en la protección contra patógenos y en la maduración inmune del tracto gastrointestinal infantil (Morrin et al., 2021).

Datos demuestran que el GML inhibe directamente el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. La actividad antibacteriana del GML contra los tres microorganismos se vio incrementada cuando se administró sinérgicamente con nisina, un antimicrobiano de uso común en productos alimenticios (Zhang et al., 2009).

En otra investigación se observó que el GML es capaz de interrumpir y prevenir la formación de biopelículas de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. El GML en combinación con sulfato de gentamicina presentó un mayor efecto bactericida contra las biopelículas de *Staphylococcus aureus* (Hess et al., 2014).

El mecanismo exacto por el cual el GML sintético ejerce su actividad bactericida de manera directa aún no está claro. Existe una hipótesis planteada que habla sobre la interrupción de la permeabilidad de la membrana celular. Los monoglicéridos no son iónicos y pueden formar micelas, esto les permite penetrar la membrana lipídica de las bacterias e interrumpir la permeabilidad celular (Schlievert & Peterson, 2012).

El GML también ha sido estudiado por su potente actividad antiviral contra diversos virus. En un estudio se expuso que la actividad antiviral del GML no depende de la unión celular,

sino que está relacionada con la interferencia directa con el virus y los cambios moduladores en la envoltura viral. En un estudio se observó que el GML redujo la unión de las células VIH-1 a las células TZM-bl en un 35 % cuando se incubó junto con la línea celular. Sin embargo, la inhibición principal del GML se produjo en la entrada viral después de la unión con el receptor celular CD4, pero antes de las interacciones con el correceptor CXCR4. Se planteó la hipótesis de que GML altera los cambios conformacionales en la estructura de la glicoproteína de envoltura gp120 trimérica del VIH necesarios para la unión del correceptor y en consecuencia se logra prevenir la replicación del VIH-1 (Welch et al., 2020).

El GML también se incubó con otros tres virus envueltos en las líneas celulares correspondientes, incluyendo el virus de las paperas, el virus de la fiebre amarilla y el ZIKV (virus Zika). Se demostró actividad antiviral contra los tres virus. Sin embargo, el GML no tuvo ningún efecto inhibitorio cuando se realizó el análisis con virus sin envoltura, incluidos el enterovirus 68 (EV68), el virus de la hepatitis A (HAV) y el adenovirus, lo que confirma nuevamente el modo de acción del GML para asociarse con la interferencia directa de la envoltura viral (Morrin et al., 2021; Welch et al., 2020).

### Lípidos misceláneos

#### Esteroles

Los oxisteroles son derivados de la oxidación del colesterol y se encuentran presentes en la leche materna en todas las etapas de la lactancia, se caracterizan por tener una amplia actividad antiviral y están involucrados en la respuesta inmune innata contra virus. Estos inhiben la replicación viral y tienen actividad tanto contra virus envueltos como no envueltos. Esta función protectora se corrobora con estudios en donde se observó *in vitro* que los oxisteroles se encontraban activos contra dos patógenos virales pediátricos relevantes como el rotavirus y el rinovirus humano, sin embargo, el mecanismo exacto de acción no está claro (Civra et al., 2019; Lembo et al., 2016; Quitadamo et al., 2021).

## **2.4 Otros componentes importantes en la leche materna**

### **2.4.a Células**

La leche materna posee una mezcla heterogénea de células que incluye leucocitos, células epiteliales, células madre y bacterias. Ciertamente, las células de la leche humana no son componentes insignificantes, pero su función aún no está del todo clara. Los leucocitos son las células más estudiadas debido a sus propiedades protectoras y su capacidad para infiltrarse en el tejido del bebé. Las células madre aún están en estudio y se conoce poco de sus funciones. Se considera que pueden jugar un papel importante en la reparación de daños en tejidos u órganos causados por varios tipos de agresiones, entre ellas el daño por patógenos (Quitadamo et al., 2021).

Al nacer, el sistema inmune del recién nacido se caracteriza por ser inmaduro y mostrar una notable diferencia en comparación con el sistema inmune del adulto, lo que representa para el bebé un mayor riesgo de infección. Sin embargo, la leche materna está perfectamente adaptada para satisfacer las necesidades requeridas y establecer un equilibrio entre la lucha contra las infecciones y la tolerancia a los compuestos ambientales inofensivos (Lokossou et al., 2022).

La lactancia materna refuerza y educa las respuestas inmunológicas neonatales permitiendo la mejor protección para el recién nacido. La leche humana es rica en células inmunes, como monocitos/macrófagos, neutrófilos, linfocitos T citotóxicos, auxiliares y reguladores, células asesinas naturales (NK) y linfocitos B. Estas células proporcionan inmunidad activa a los recién nacidos por su capacidad para producir moléculas bioactivas como lactoferrina, lisozima, oligosacáridos, citoquinas entre otros (Lewis et al., 2017; Lokossou et al., 2022).

Las células B completan estas moléculas bioactivas produciendo inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM secretoras). La leche materna da forma al desarrollo del sistema inmunológico del recién nacido y está implicada en el desarrollo de la microbiota del lactante. La proporción de leucocitos es significativamente mayor en el calostro que en la leche de transición y en la leche madura (Lokossou et al., 2022).

## 2.4.b Microbiota

Los seres humanos han evolucionado para desarrollar una relación simbiótica con las bacterias comensales que componen el microbioma intestinal. A pesar de la proximidad y el potencial peligro para la salud entre la variedad de comunidades bacterianas y la superficie intestinal, el sistema inmunológico del hospedador se ha desarrollado para contener y trabajar junto con la microbiota a fin de mantener la homeostasis a nivel del intestino. Existe suficiente evidencia que sugiere que la exposición a bacterias comensales en los primeros años de vida es crucial para el desarrollo apropiado del sistema inmunológico; además se ha demostrado que la interrupción de esta relación simbiótica puede conducir a inflamación y enfermedades intestinales (Hooper et al., 2012; Quin & Gibson, 2019; Thai & Gregory, 2020).

Las funciones principales de la microbiota intestinal en beneficio del hospedador son: facilitar la descomposición de sustancias alimenticias para liberar nutrientes, promover la diferenciación celular, evitar la colonización patógena y modular el sistema inmunológico. La interrupción de la homeostasis de la microbiota intestinal provoca cambios en el equilibrio de la microbiota o disbiosis. Se ha demostrado que la disbiosis intestinal está asociada con problemas para la salud a largo plazo, como obesidad, diabetes y enfermedad inflamatoria intestinal, así como enterocolitis necrotizante en bebés prematuros (Milani et al., 2017; Neu & Walker, 2011; Thai & Gregory, 2020).

La enterocolitis necrotizante, es una enfermedad inflamatoria aguda del intestino que afecta principalmente a los recién nacidos prematuros y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la unidad de cuidados intensivos neonatales. La patogenia de la enterocolitis solo se comprende en parte, pero es probable que implique una respuesta inmunológica alterada de la barrera intestinal a la alimentación y al microbioma en desarrollo (Bellodas Sanchez & Kadrofske, 2019).

Se ha observado que la composición microbiana intestinal de los lactantes que desarrollan enterocolitis necrotizante consiste en especies microbianas inusuales y una disminución general de la diversidad de la microbiota. Por lo tanto, se puede concluir que la adquisición de una microbiota apropiada es esencial para la salud intestinal y la prevención de

enfermedades inflamatorias (Bellodas Sanchez & Kadrofske, 2019; Mshvildadze et al., 2010; Neu & Walker, 2011; Thai & Gregory, 2020).

La importancia de la microbiota en la leche materna se puede evidenciar por las diferencias observadas en la microbiota intestinal de los bebés amamantados en comparación con aquellos alimentados con fórmula infantil. Los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna tienen una mayor abundancia de especies bacterianas de los géneros *Bifidobacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, mientras que los lactantes alimentados con fórmula infantil tienen una mayor abundancia de especies de los géneros *Bacteroides*, *Clostridium* y *Enterococcus*, además bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Zimmermann & Curtis, 2020).

La composición de la microbiota intestinal es crucial para el desarrollo del sistema inmunológico y su alteración se ha asociado con problemas futuros para la salud como el desarrollo de enfermedades alérgicas, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, obesidad, diabetes mellitus, entre otras (Zimmermann & Curtis, 2020).

Se ha demostrado que la leche humana tiene un microbioma único y es una de las principales fuentes de bacterias para el intestino de un bebé alimentado principalmente con leche materna. Se estima que la leche materna proporciona el 25 % de la microbiota intestinal de un bebé amamantado al mes de edad como resultado de la exposición diaria a aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  bacterias y más de 700 especies bacterianas. Por lo tanto, la microbiota de la leche materna influye en la adquisición y establecimiento del microbioma intestinal durante la infancia y se cree que es un factor importante involucrado en la inmunidad innata durante los primeros años de vida (Fitzstevens et al., 2017; Pannaraj et al., 2017; Thai & Gregory, 2020).

Los géneros más comúnmente reportados en la leche humana incluyen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Ralstonia* y *Bacteroides* así como la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, los tipos y cantidades de bacterias en la leche humana se ven afectados por muchos factores maternos como: la genética, el índice de masa corporal (IMC), la edad gestacional, patologías de las glándulas mamarias, la dieta, la etapa de lactancia y la ubicación geográfica (Carr et al., 2021;

Fitzstevens et al., 2017; Gomez-Gallego et al., 2016; Schwab et al., 2019; Thai & Gregory, 2020; Urbaniak et al., 2016).

La microbiota de la leche humana promueve el establecimiento de un perfil saludable de bacterias intestinales, lo que conduce a la maduración del sistema inmune innato y adaptativo del bebé. Por ejemplo, en un estudio se observó que las bacterias intestinales como *Lactobacillus pentosus* promueven el desarrollo de células B en las placas de Peyer y aumentan la liberación de IgA en la mucosa, la cual actúa como primera línea de defensa (Carr et al., 2021; Hashizume et al., 2008; Kotani et al., 2014).

Se ha observado *in vitro* que las bacterias de la leche materna también pueden mejorar la respuesta contra las infecciones a través de la inducción de la maduración de células Th1 citotóxicas. Las bacterias del género *Lactobacillus* en la leche humana pueden aumentar la liberación de citoquinas de respuesta Th1 y TNF- $\alpha$ , activar las células NK, TCD4+, TCD8+ y T reguladoras (Carr et al., 2021).

Se sabe que las bacterias comensales de la leche materna como *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus crispatus* tienen capacidad de adhesión a las células intestinales, lo que indica una mayor colonización de bacterias beneficiosas en el intestino de los lactantes amamantados, además bacterias como *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus gasseri* y *Streptococcus salivarius* limitan la adhesión de patógenos a las células epiteliales intestinales según estudios realizados *ex vivo* (Carr et al., 2021; Damaceno et al., 2017).

Las bacterias comensales en la leche humana también poseen propiedades antiinflamatorias que desempeñan un papel protector en el tracto gastrointestinal durante la infancia. En un estudio se observó que *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y *Bifidobacterium infantis* suprimieron la liberación de IL-8 (citocina proinflamatoria) en la línea celular intestinal Caco-2 incubada con *Salmonella* patógena, lo que respalda la idea de que las bacterias de la leche humana podrían proteger el intestino del bebé contra el daño epitelial (Carr et al., 2021; Malago et al., 2010).

Se ha demostrado que las bifidobacterias modulan la inflamación y aumentan la producción de ácidos grasos de cadena corta en el colon tanto en ratones como en humanos. Además, se

ha visto que la falta de especies pertenecientes al género *Bifidobacterium* está asociada con enterocolitis necrotizante (Embleton et al., 2017; Smith et al., 2013; Thai & Gregory, 2020).

El papel de las bifidobacterias en la atenuación de la inflamación intestinal se ha destacado en múltiples investigaciones. En un estudio realizado en crías de rata sometidas a hipoxia y estrés al frío, se observó que las crías alimentadas con fórmula suplementada con *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* tuvieron una menor incidencia de NEC, así como una menor expresión de mediadores proinflamatorios como IL-6, quimiocina-1 (CXCL-1), TNF- $\alpha$  e IL-23, así como óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Underwood et al., 2014).

Por otra parte, en otro estudio se demostró que *Lactobacillus rhamnosus* SHA113 aislado de la leche materna, inhibe *in vitro* e *in vivo* la infección intestinal por *Escherichia coli* multirresistente (MDR por multi-drug resistant), al bloquear las vías proinflamatorias y restaurar la homeostasis en la microbiota intestinal. Se observó la reducción de citocinas proinflamatorias séricas como TNF- $\alpha$  e IL-6 y un incremento de la citocina antiinflamatoria IL-10 en los ratones que recibieron *Lactobacillus rhamnosus* SHA113 después de la infección causada por *E. coli* MDR, en comparación con los que no recibieron tratamiento (Thai & Gregory, 2020).

Estos estudios proporcionan evidencia del papel de la microbiota de la leche materna en el desarrollo intestinal adecuado de los lactantes y como esta confiere protección contra el daño epitelial causado por la inflamación.

#### 2.4.c Citocinas y factores de crecimiento

Las citocinas son pequeñas proteínas o péptidos que actúan como mensajeros intercelulares y desencadenan una respuesta particular después de unirse a un receptor en una célula blanco. La leche materna posee gran variedad de factores de crecimiento y citocinas que pueden llegar inalteradas al intestino, gracias a los inhibidores de la proteasa ( $\alpha$ 1-antiquimotripsina y  $\alpha$ 1-antitripsina) presentes en la leche que las preservan de la digestión. Entre ellos están el factor de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ), la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10, IL-12, el TNF- $\alpha$ , interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el factor estimulante de colonias de

granulocitos y macrófagos (GM-CSF), entre otras (Quitadamo et al., 2021; Thai & Gregory, 2020).

Dentro de las respuestas obtenidas están la mediación y regulación de la inmunidad, la hematopoyesis y la inflamación. Se ha demostrado que la IL-10, el TGF- $\beta$ , el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) y el receptor del factor de necrosis tumoral I y II (TNFR I y II) tienen funciones antiinflamatorias (Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016; Thai & Gregory, 2020).

El contenido de citocinas de la leche materna puede verse afectado por diferentes factores, como la edad gestacional, la dieta materna, las infecciones, el tabaquismo, el origen étnico de la madre o el ejercicio. Además, el perfil de citocinas fluctúa a lo largo de las diferentes etapas de la lactancia (Gila-Diaz et al., 2019).

#### Factores antiinflamatorios

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria e inmunorreguladora presente en altas concentraciones tanto en la fase acuosa como en la capa lipídica de la leche humana. Su concentración es mayor en el calostro (Gila-Diaz et al., 2019; Thai & Gregory, 2020).

Esta citocina es un potente antiinflamatorio que inhibe específicamente la actividad de los linfocitos T-cooperador 1 (Th1), las células asesinas naturales (NK), los macrófagos y la producción de varias citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ), atenuando la respuesta inmune. La IL-10 aumenta la supervivencia y la expansión de las células B, inhibe las respuestas Th1 y regula la disminución de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad II en los monocitos, lo que limita su función de célula presentadora de antígenos. La IL-10 ha estado fuertemente implicada en la regulación de la inflamación intestinal y la regulación de las respuestas al microbioma (Quitadamo et al., 2021; Thai & Gregory, 2020).

Un aspecto interesante que se ha podido observar, es el hallazgo de una menor cantidad de IL-10 en la leche de las madres de los lactantes con mayor riesgo de enterocolitis necrotizante, lo que sugiere que la accesibilidad de esta citocina en la leche materna puede

ser importante para modular la respuesta inflamatoria neonatal (Abdelhamid et al., 2013; Gila-Diaz et al., 2019).

En un estudio realizado en ratones genéticamente incapaces de producir IL-10, se pudo observar una respuesta inmune exacerbada hacia una microbiota intestinal normal. Estos ratones finalmente desarrollaron una enterocolitis similar a la colitis ulcerosa y la enfermedad celíaca en humanos, lo que enfatiza la importancia de la IL-10 en la supresión de la inflamación (Lepage & Van De Perre, 2012; Sydora et al., 2003; Thai & Gregory, 2020).

El factor de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ) es una citocina antiinflamatoria producida principalmente por células parenquimatosas y células como linfocitos, macrófagos y plaquetas. La familia del TGF- $\beta$  comprende las citocinas más abundantes en la leche humana. Los niveles más altos se encuentran en el calostro y disminuyen sustancialmente entre las 4 y 6 semanas de vida. Durante la lactancia, se producen las tres isoformas de esta superfamilia donde TGF- $\beta$ 2 es la que predomina (Gila-Diaz et al., 2019; Thai & Gregory, 2020).

El TGF- $\beta$  posee una gran variedad de propiedades inmunomoduladoras de importancia para el lactante, que incluyen la estimulación de la maduración intestinal y defensa inmunológica al promover el cambio de IgM a IgA en los linfocitos B. Además, estimula la producción de inmunoglobulinas en la glándula mamaria y el tracto gastrointestinal del recién nacido, participa en la reparación de la mucosa intestinal y suprime la actividad de los linfocitos T neonatales, lo que permite la tolerancia oral e intestinal (Gila-Diaz et al., 2019; Thai & Gregory, 2020).

La tolerancia oral mediada por TGF- $\beta$  y la síntesis de anticuerpos IgA juegan un papel esencial en el desarrollo inmunológico de los recién nacidos. Algunos estudios han demostrado que después de la exposición materna a ambientes altamente microbianos (granjas) aumenta la concentración de TGF- $\beta$  en la leche materna. Por lo tanto, los niveles aumentados de TGF- $\beta$  e IgA en el calostro reflejan su propósito de atacar los antígenos microbianos y mejorar la función de barrera de la mucosa. Se ha propuesto que, durante el período de gestación y lactancia, se produce un aumento de la síntesis de TGF- $\beta$ , debido a la infiltración de células inmunes en el tejido mamario. Estos estudios proponen que la

producción local de TGF- $\beta$  en las glándulas mamarias puede ser responsable de las elevadas concentraciones observadas en la leche humana (Gila-Diaz et al., 2019; Peroni et al., 2010; Reed & Schwertfeger, 2010; Rogier et al., 2014).

El TGF- $\beta$  puede regular la inflamación al disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias. En un estudio de pacientes pediátricos con enfermedad de Crohn, se realizó una prueba de alimentación que consistió en administrar TGF- $\beta$  como suplemento, lo que resultó en una disminución del ARNm de IL-1 (citocina proinflamatoria) en la mucosa y la remisión clínica en el 79 % de los pacientes (Fell et al., 2000; Thai & Gregory, 2020).

El TGF- $\beta$  también inhibe la diferenciación de las células T vírgenes a los subtipos Th1 y Th2. En el caso de los linfocitos Th1, promueven respuestas inmunológicas mediadas por células mediante la secreción de citocinas proinflamatorias; y los Th2 promueven respuestas IgE y eosinofílicas. El TGF- $\beta$  también ayuda a estabilizar la expresión del factor de transcripción forkhead box P3 (FOXP3) que mantiene la diferenciación de las células T reguladoras que inhiben las respuestas inmunológicas y atenúan la inflamación (Dawod & Marshall, 2019; Thai & Gregory, 2020).

Se ha observado en bebés prematuros, que los niveles más bajos de TGF- $\beta$  preceden al desarrollo de NEC, lo que recalca la importancia de este factor en la regulación inmunológica y la inflamación (Maheshwari et al., 2014; Thai & Gregory, 2020).

Otras citocinas actúan como antagonistas directos de la señalización proinflamatoria. El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) también está presente en la leche humana y limita la inflamación al competir con la citocina proinflamatoria IL-1 por la unión al receptor. El TNFR I y II, aunque están presentes en pequeñas cantidades en la leche materna, estos se unen directamente e inhiben el TNF- $\alpha$ , una citocina proinflamatoria producida por una amplia gama de células inmunes (macrófagos, linfocitos T, neutrófilos, entre otras) (Thai & Gregory, 2020).

El receptor tipo toll 2 soluble (sTLR2) está presente en altas concentraciones en la leche materna y actúa como un mecanismo regulador negativo para las citocinas y quimiocinas. Se ha evidenciado que el TLR2 soluble actúa como un receptor señuelo y se une a lipoproteínas

bacterianas, evitando de esta forma la estimulación de monocitos y la síntesis de IL-8 y TNF (Henrick et al., 2012; Liew et al., 2005).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un péptido abundante en la leche materna y es importante para preservar la función de barrera intestinal, mejorar el transporte de nutrientes y aumentar la actividad de las enzimas intestinales. El EGF promueve el crecimiento y la maduración del epitelio pulmonar fetal, estimula la actividad de la ornitina descarboxilasa y la síntesis de ADN en el tracto digestivo; también acelera la cicatrización de heridas. El EGF es más alto en calostro y disminuye durante la lactancia. Además, la leche prematura contiene niveles más altos que la leche a término (Quitadamo et al., 2021; Thai & Gregory, 2020).

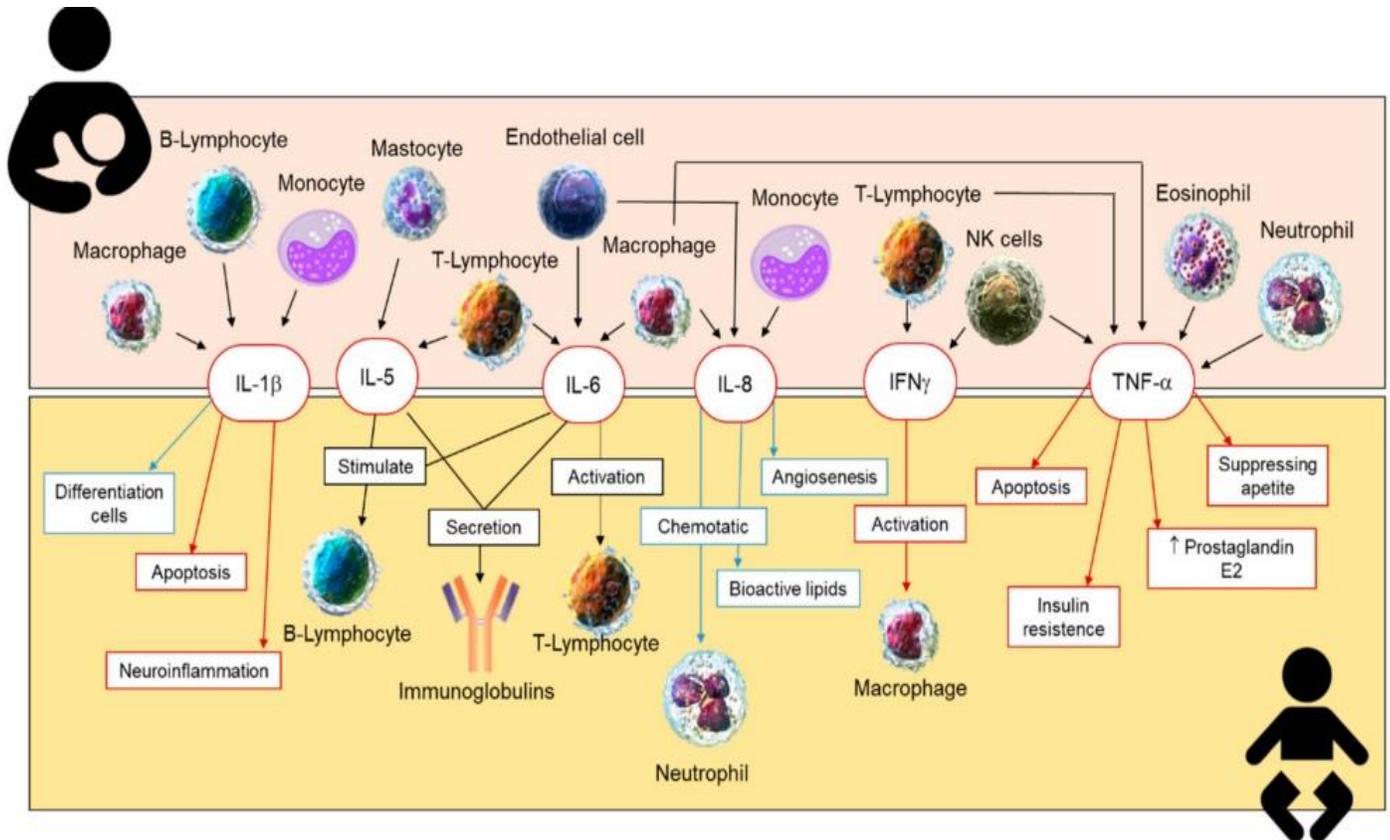
Los estudios realizados en ratas con enterocolitis necrotizante inducida de manera experimental demostraron que cuando estas fueron tratadas con EGF disminuyó la inflamación intestinal y los niveles de IL-18 en el sitio de la lesión, así como los niveles de ARNm de esta citocina. La IL-18 es una citocina proinflamatoria que se ha asociado con enfermedades inflamatorias del intestino delgado. También se ha demostrado que el EGF tiene efectos antiinflamatorios indirectos al regular el aumento de IL-10 (Coursodon & Dvorak, 2012; Halpern et al., 2002; Thai & Gregory, 2020).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) también es una glicoproteína presente en la leche materna, se encuentra en niveles más altos en el calostro y en la leche de madres con bebés prematuros. Su papel principal es mediar en la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos). Sin embargo, se ha sugerido que el VEGF también puede tener efectos antiinflamatorios. En un estudio realizado en ratas inducidas con enterocolitis necrotizante y que recibieron VEGF subcutáneo, se observó que presentaron menos atrofia de las vellosidades y menos edema intestinal, así como niveles más bajos de TNF- $\alpha$  e IL-6 en comparación con aquellas que no fueron tratadas con VEGF (Karatepe et al., 2014; Ozgurtas et al., 2010; Thai & Gregory, 2020).

### Factores proinflamatorios

Las citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$ , también están presentes en la leche materna (Figura 13), disminuyen con el tiempo y están en cantidades mucho más

bajas que las citocinas inmunorreguladoras mencionadas anteriormente. Ciertas citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  están disminuidas en la leche materna de los bebés prematuros en comparación con la leche de los bebés nacidos a término. Esto sugiere que la composición de citocinas de la leche humana ayuda a regular la inflamación intestinal en los recién nacidos y puede adaptarse a las necesidades particulares del sistema inmunológico del lactante (Thai & Gregory, 2020; Ustundag et al., 2005).



**Figura 13.** Síntesis de las citocinas inflamatorias presentes en la leche materna y su efecto en el neonato. IL-1 $\beta$ , interleucina-1 $\beta$ ; IL-5, interleucina-5; IL-6, interleucina-6; IL-8, interleucina-8; IFN $\gamma$ , interferón gamma; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral alfa (Tomado de Gila-Díaz et al., 2019).

Mencionando de manera general las citocinas proinflamatorias más importantes y recalcando su función beneficiosa en el lactante; la IL-1 $\beta$  es un mediador de la respuesta inflamatoria y está involucrada en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Se ha observado que cuanto más altos son los niveles de IL-1 $\beta$  en la leche humana, mayor es la protección contra el eczema en bebés (Gila-Díaz et al., 2019; Hawkes et al., 1999; Munblit et al., 2017).

Se ha observado que los recién nacidos carecen de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , 2 citocinas proinflamatorias eficaces. El IFN- $\gamma$  es secretado por las células T y las células NK activadas, incluso en bajas concentraciones, participa en las vías de señalización que aumentan la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal y mejoran la activación de los macrófagos intestinales. El IFN $\gamma$  mejora la respuesta Th1 (inflamación) al mismo tiempo que suprime la reacción Th2 (alérgica). Se ha reportado que el calostro de las madres alérgicas contiene menos IFN $\gamma$  y posee más citocinas del perfil Th2, IL-4 e IL-13 en comparación con las madres no alérgicas. El TNF- $\alpha$  es un pirógeno endógeno que contribuye a la inflamación sistémica y realiza una función reguladora de las células inmunes (Agarwal et al., 2011; Gila-Diaz et al., 2019; Hrdý et al., 2012; Quitadamo et al., 2021).

El calostro humano tiene una alta concentración de IL-8, que se reduce significativamente en las últimas etapas de la lactancia. Se ha sugerido que esta citocina posee un papel importante en el desarrollo fisiológico del intestino. Se observó que la exposición *in vitro* de células intestinales intactas o lesionadas a la IL-8 recombinante estimuló la proliferación y diferenciación de las células intactas y otorgó una mayor vitalidad a las que estaban lesionadas (Maheshwari et al., 2002; Quitadamo et al., 2021).

Una característica interesante de la leche materna es que tiene la posibilidad de obtener sistemas inflamatorios y antiinflamatorios en un equilibrio que depende de las condiciones que lo requieran. Se necesitan más investigación sobre el papel de las citocinas en la leche materna y cómo influyen en la salud neonatal (Gila-Diaz et al., 2019; Quitadamo et al., 2021).

## **Capítulo 3: Propiedades de los componentes bioactivos de la leche materna contra el SARS-CoV-2 y la COVID-19**

### SARS-CoV-2 y la COVID-19

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2), que causa la enfermedad COVID-19, se propagó rápidamente por todo el mundo desde que fue descubierto en diciembre del 2019. En marzo del 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el brote del nuevo coronavirus como pandemia global. Según informes de la OMS, alrededor de 500 millones de personas en el mundo se han visto afectadas por la COVID-19 y se han registrado más de 6 millones de muertes hasta el 1 de julio del 2022. En la mayoría de los países, la pandemia por COVID-19 ha sobrecargado los servicios de salud y ha provocado enormes pérdidas económicas (Einerhand et al., 2022; Kaplan et al., 2022).

Ciertas poblaciones exhiben un mayor riesgo de desarrollar una condición grave de la enfermedad, entre ellas personas con enfermedades cardíacas, respiratorias, metabólicas y autoinmunes preexistentes. Aunque los niños se han visto menos afectados que los adultos por la COVID-19, los bebés y los recién nacidos son el grupo pediátrico de mayor riesgo, puesto que también pueden ser más propensos a desarrollar una enfermedad grave tras la infección por SARS-CoV-2 en comparación con las poblaciones pediátricas de mayor edad (Pullen et al., 2021; Zheng et al., 2022).

Esta distribución bimodal de la gravedad de la enfermedad que muestra susceptibilidad aumentada en los primeros años de vida y después nuevamente en la edad adulta, se parece a la que se observa en otras enfermedades respiratorias, como la influenza y la tuberculosis. Sin embargo, siguen sin estar claros los mecanismos específicos que subyacen a este cambio dependiente de la edad en la susceptibilidad a los patógenos respiratorios (Pullen et al., 2021).

### Componentes de la leche materna y sus propiedades potenciales contra SARS-CoV-2 y la COVID-19

Las infecciones respiratorias son una de las principales causas de morbilidad en los niños y específicamente las causadas por SARS-CoV-2 no se comprenden aún del todo. Los niños menores de 13 años generalmente tienen síntomas leves o ningún síntoma. En casos raros, los niños infectados desarrollan el síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C), que parece ser una condición autoinmune que se desarrolla después de la infección, similar a la enfermedad de Kawasaki (Pérez-bermejo et al., 2021).

Durante el primer año de vida, la lactancia materna proporciona protección frente a estas infecciones, principalmente contra infecciones de las vías respiratorias inferiores. La inmadurez del sistema inmunológico del lactante al nacer incrementa el riesgo de infección por agentes patógenos como virus y bacterias. Esto se relaciona con la falta de preparación de las vías respiratorias y gastrointestinales del recién nacido para resistir a la invasión (Vassilopoulou et al., 2021).

La protección antiinfecciosa, antiinflamatoria e inmunomoduladora brindada por la leche materna se efectúa tanto por componentes químicos como por interacciones celulares, como se estudió anteriormente. La función de los componentes bioactivos de la leche materna contra el SARS-CoV-2 y la COVID-19 actualmente es un campo que se encuentra en desarrollo, por lo que estudiar la evidencia *in vivo* e *in vitro* que muestra cómo estos componentes son capaces de realizar funciones teóricamente útiles en los eventos patogénicos reconocidos y descritos en la enfermedad COVID-19, puede dar una idea de la protección brindada por la leche humana. Sin embargo, se requieren más estudios específicos para el SARS-CoV-2 (Quitadamo et al., 2021).

#### Oligosacáridos de la leche materna y sus efectos potenciales en la COVID-19

Los efectos beneficiosos observados de los HMOs presentes en la leche materna como la prevención de infecciones, el mantenimiento de la homeostasis y el fortalecimiento de la microbiota intestinal, lleva al planteamiento de la hipótesis que estos podrían desempeñar funciones importantes contra las consecuencias provocadas por la COVID-19 (Chutipongtanate et al., 2022).

Estas posibles aplicaciones se pueden estudiar mediante los 4 mecanismos principales ejecutados por los HMOs (figura 14) (Chutipongtanate et al., 2022):

- 1- Mecanismo de receptor señuelo
- 2- Mecanismo antiinflamatorio e inmunoregulador
- 3- Agentes de señalización de la mucosa intestinal
- 4- Efecto prebiótico

Aunque estos mecanismos ya fueron analizados en capítulos anteriores, en esta sección se le dará el enfoque respecto a su posible aplicación en la COVID-19.

#### Oligosacáridos de la leche materna como receptores señuelo

El primer paso obligatorio mediante el cual el virus SARS-CoV-2 inicia una infección es la unión de su proteína S al receptor ACE2 localizado en la superficie celular de la mucosa del hospedador. Se sabe que el receptor ACE2 humano se encuentra altamente glicosilado y estas fracciones glicosiladas pueden modular directamente la interacción con la proteína S. Se ha visto que el HBGA de tipo A se relaciona con el proceso de entrada del SARS-CoV-2 a la célula, ya que el dominio de unión al receptor de la proteína S viral se une a este. Se ha demostrado que las personas con el grupo sanguíneo de tipo A son más susceptibles a la infección por SARS-CoV-2 (Chutipongtanate et al., 2022; Liu, Zhang et al., 2021; Wu et al., 2021; Zhao et al., 2020).

Como los HMOs fucosilados (por ejemplo, el 2'FL) poseen similitud en la estructura molecular con los HBGA, podrían de manera hipotética actuar como receptor señuelo y bloquear la unión y la entrada del virus SARS-CoV-2 a la célula diana (figura 14a) (Chutipongtanate et al., 2022).

#### Oligosacáridos de la leche materna como agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores

La fisiopatología de la COVID-19 tiene dos fases principales: la replicación viral en la fase inicial y la desregulación inmunológica que se desarrolla en la fase posterior. Esta desregulación en el sistema inmune da como resultado un desequilibrio entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, lo que conlleva a la pérdida de la homeostasis inmune

que se manifiesta con niveles elevados de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ . Además, se puede observar linfopenia, defectos en las células inmunes (linfocitos T, monocitos y células dendríticas) y alteración en la respuesta mediada por IFN tipo I. Este desbalance en el sistema inmune puede provocar shock séptico, SDRA, insuficiencia multiorgánica y muerte (Chutipongtanate et al., 2022).

Los HMOs muestran efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores al unirse directamente a las lectinas presentes en la superficie de las células inmunes (por ejemplo, monocitos, macrófagos y células dendríticas) para desencadenar cambios en la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10. Además, están involucrados en la maduración de las células dendríticas (figura 14b) (Chutipongtanate et al., 2022; Comstock et al., 2014; Velupillai & Harn, 1994; Xiao et al., 2019).

Las células dendríticas plasmocitoides son un subconjunto de células dendríticas maduras, que han sido reconocidas por liberar grandes cantidades de IFN de tipo I tras la estimulación viral, por lo que son catalogadas como células especialistas antivirales. El IFN tipo I (IFN $\alpha$  y  $\beta$ ) activa receptores, factores y genes específicos que establecen un estado antiviral en las células infectadas y en las células vecinas con el objetivo de suprimir la replicación viral (Bencze et al., 2021; Chutipongtanate et al., 2022; Schoggins & Rice, 2011).

En un estudio se demostró que la leche humana desencadena la producción de IFN tipo I en lactantes infectados con el virus de la influenza (Melendi et al., 2010). Dado que la leche humana puede desencadenar respuestas inmunoprotectoras por parte del hospedador se podría pensar que esta inducción antiviral podría extenderse a otros virus como el SARS-CoV-2 (Chutipongtanate et al., 2022; Vassilopoulou et al., 2021).

Se ha planteado la hipótesis de que los HMOs también podrían desencadenar la producción de IFN tipo I o inducir la maduración de las células dendríticas plasmocitoides, lo que promovería un estado antiviral, sin embargo, aún no se han realizado estudios que puedan comprobar dicha suposición (Chutipongtanate et al., 2022).

Oligosacáridos de la leche materna como agentes de señalización de la mucosa

Se ha demostrado que la proteína S del SARS-CoV-2 puede unirse y activar la señalización del receptor TLR4 que media en la inflamación de la mucosa respiratoria y la lesión pulmonar aguda en la COVID-19. Esta interacción induce la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 (Chutipongtanate et al., 2022; Kaushik et al., 2021; Zhao et al., 2021).

Se sabe que los HMOs modulan las cascadas de señalización de la mucosa por medio de los PPRs y entre ellos se encuentra el TLR4 (ver capítulo 1 y 2). Los HMOs alteran la expresión génica en las células epiteliales intestinales lo que promueve la maduración de las células intestinales, la función de barrera de la mucosa, la reparación de tejidos y la integridad de las uniones estrechas, mientras que atenúan la inflamación a través de la supresión de receptores como el TLR4 (Chleilat et al., 2020; Chutipongtanate et al., 2022; He et al., 2016).

Los HMOs también pueden modular directamente la señalización inflamatoria de la mucosa al atenuar la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ . Además, modulan el desarrollo del glicocálix intestinal que apoya la colonización microbiana y la función de barrera de la mucosa (figura 14c) (Chutipongtanate et al., 2022).

Debido a todas estas propiedades observadas en los HMOs ya sea como mezclas o como moléculas individuales, se ha propuesto que pueden ser de utilidad para inhibir el receptor TLR4 y así suprimir la señalización proinflamatoria provocada por este en pacientes con COVID-19 (Chutipongtanate et al., 2022).

#### Oligosacáridos de la leche materna como prebióticos

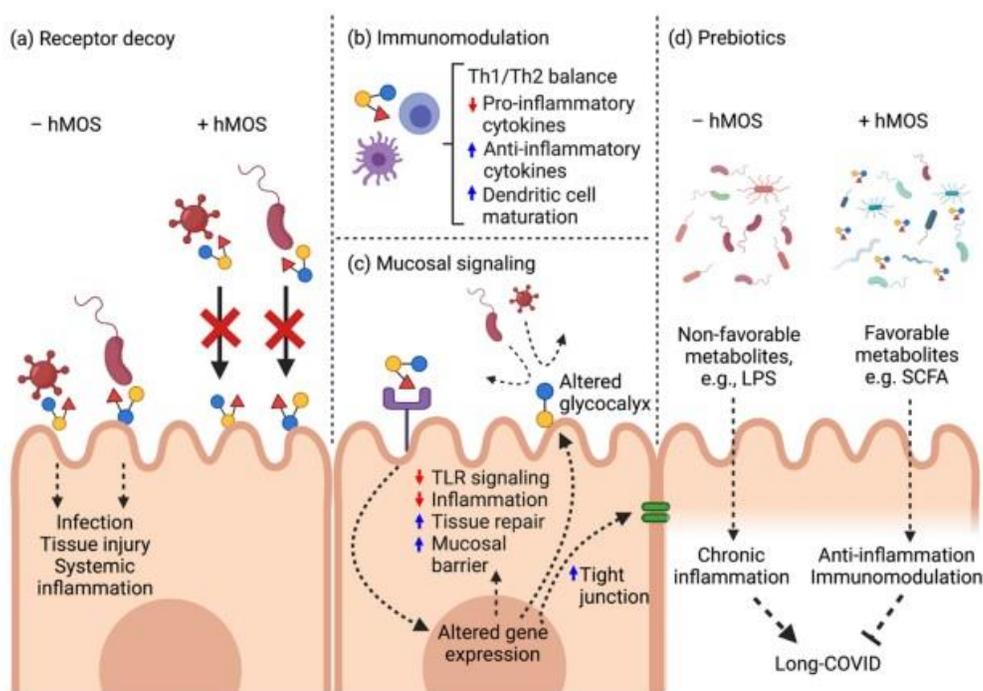
La microbiota intestinal sana proporciona beneficios para la salud al controlar la homeostasis intestinal y al colaborar con la regulación de las respuestas inmunológicas locales y sistémicas. Los ácidos grasos de cadena corta como el acetato, el butirato y el propionato producidos por la fermentación de los HMOs proporcionan energía a las células epiteliales intestinales, intervienen en la homeostasis intestinal y poseen propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Por el contrario, la disbiosis intestinal permite un incremento de microorganismos patógenos que generan productos tóxicos, especialmente el LPS, que agravan la inflamación mucosa y sistémica (figura 14d) (Chutipongtanate et al., 2022).

Los pacientes con COVID-19 pueden presentar disbiosis durante todo el curso de la enfermedad (desde el inicio hasta la eliminación viral), esto puede persistir incluso después de la resolución de esta. La disbiosis intestinal se caracteriza por el desequilibrio entre bacterias beneficiosas, por ejemplo, especies pertenecientes a los géneros *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* entre otros; y microorganismos patógenos oportunistas como especies de los géneros *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, *Clostridium* etc (Chutipongtanate et al., 2022; Gu et al., 2020; Yeoh et al., 2021; Zuo et al., 2020).

Se ha observado una relación entre la disbiosis intestinal en pacientes con COVID-19 y los mediadores inflamatorios. Por ejemplo, se encontró en pacientes con COVID-19 grave que presentaron disbiosis intestinal, niveles elevados de citocinas inflamatorias como TNF $\alpha$  y CXCL10, además de marcadores inflamatorios de daño tisular como la proteína C reactiva, lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamyl transferasa (GGT), entre otros. Esto sugiere que la alteración en la microbiota podría tener un papel importante en la regulación del sistema inmune y en la gravedad de la COVID-19 (Chutipongtanate et al., 2022; Yeoh et al., 2021).

Debido a que los HMOs tienen un fuerte efecto en la conformación de una microbiota intestinal saludable, al servir como sustrato de crecimiento selectivo para microorganismos beneficiosos como las bifidobacterias, podrían tener un alto potencial de protección en el lactante. Además, podrían utilizarse para tratar las infecciones por COVID-19 y sus secuelas (Chutipongtanate et al., 2022).

Como se pudo observar, los HMOs han sido reconocidos por sus propiedades y su posible aplicación contra las complicaciones que resultan de la COVID-19. Sin embargo, no hay evidencia directa de la actividad contra el SARS-CoV-2 en la literatura (Chutipongtanate et al., 2022).



**Figura 14:** Posibles modos de acción de los HMOs contra SARS-CoV-2. (a) Las estructuras moleculares de los HMOs son análogos a los HBGA y actúan como receptores señuelo para bloquear la entrada viral. (b) Los HMOs inducen defensa local e inmunomodulación. (c) Los HMOs atenúa las vías de señalización mediadas por TLR4 para mantener la homeostasis de la mucosa. (d) Los HMOs mitigan la disbiosis intestinal y restauran la microbiota intestinal sana en pacientes con COVID-19 prolongado (Tomado de Chutipongtanate et al., 2022).

### Proteínas y otros componentes de la leche materna

La epidemia del 2003 por SARS-CoV-1 dejó cierto conocimiento que fue de utilidad en el contexto de la COVID-19, ya que estos virus poseen un alto grado de homología. Un aporte importante fue que la lactoferrina evita el contacto inicial entre el pseudovirus SARS-CoV y las células HEK293E/ACE2-Myc, ya que interactúa con los receptores celulares de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs), lo que interfiere con los primeros sitios de anclaje del virus en la célula hospedadora (Lang et al., 2011; Quitadamo et al., 2021).

A través de estudios se ha observado que la lactoferrina puede ejercer un impacto antiviral de diferentes maneras: mediante la unión a los receptores celulares en las células hospedadoras y a través de la estimulación del sistema inmune (Kaplan et al., 2022).

Se ha evidenciado que además del receptor celular ACE2, los HSPGs también tienen una participación importante en la unión del SARS-CoV-2 a las células hospedadoras al actuar como un factor de unión. La unión de la proteína S viral a los HSPGs conduce al enriquecimiento del virus en la superficie celular facilitando la posterior unión específica con el receptor ACE2. Por lo tanto, el bloqueo de las interacciones entre la proteína S del virus y los HSPGs conducirá a la inhibición de la replicación viral (Hu et al., 2021).

En un estudio se demostró que la lactoferrina bovina y humana son capaces de bloquear de manera eficaz la entrada del SARS-CoV-2 y otros coronavirus humanos comunes (HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-229E) en diferentes líneas celulares como Calu-3 y 293 T-ACE2. Esto mediante el mecanismo de inhibición de la unión a la célula hospedadora a través de los receptores celulares de HSPGs presentes en la membrana celular (Hu et al., 2021; Kaplan et al., 2022).

En otro estudio más reciente realizado *in vitro* en múltiples líneas celulares, se identificó que la LF, la mucina 1 (MUC1) y la  $\alpha$ -lactoalbúmina de la leche humana inhiben la infección por un pseudovirus de SARS-CoV-2. Se observó que la LF y la MUC1 desempeñan un papel fundamental no sólo en el bloqueo de la unión viral y la entrada en las células hospedadoras, sino también en la supresión de la replicación posterior a la entrada del virus en las diferentes líneas celulares, en comparación con la  $\alpha$ -La que sólo pudo bloquear la unión viral y la entrada a las células (Lai et al., 2022).

Se evidenció que la LF y la MUC1 no bloquearon la interacción entre el receptor celular ACE2 y la proteína S del virus, lo que indicó que estas proteínas suprimen la infección por SARS-CoV-2 por mecanismos independientes de la vía ACE2, como lo es la unión a HSPGs, expuesto anteriormente en otros estudios. Por otra parte, los ensayos revelaron que la  $\alpha$ -lactoalbúmina sí interfirió con la asociación entre la proteína S y el receptor ACE2. Por lo que se plantea que estas 3 proteínas que componen la leche materna son potenciales candidatos terapéuticos y antivirales prometedores para tratar la COVID-19 (Lai et al., 2022).

En cuanto a la estimulación del sistema inmune; la LF contiene un extremo N terminal cargado positivamente, por lo que puede unirse a superficies celulares con cargas negativas como los proteoglicanos, regulando así las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas e

influyendo en la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Einerhand et al., 2022). Un mecanismo de acción antiviral de la LF es a través de la mejora de las respuestas inflamatorias, esta puede modular las respuestas inmunológicas innatas de las células hospedadoras a través de una mayor expresión de genes estimulados por IFN tipo I y TNF $\alpha$ ; y de esta manera bloquear la replicación del virus una vez que se encuentra dentro de la célula hospedadora (Kaplan et al., 2022; Mirabelli et al., 2021).

La LF también podría participar en otro evento patogénico de la COVID-19, como lo es el efecto procoagulante y la trombosis difusa que afecta principalmente los vasos pulmonares y cardíacos. Se ha observado que el impacto de la coagulopatía es de gran importancia pronóstica en los pacientes afectados por COVID-19 (Quitadamo et al., 2021).

Se ha evidenciado que la LF puede actuar como un inhibidor natural y específico de la activación del plasminógeno (que cuando se activa forma plasmina) mediada por el activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPa). En el proceso de apoptosis, la LF secretada por las células apoptóticas podría ser necesaria para disminuir la actividad de la plasmina extracelular y evitar la degradación no deseada del tejido circundante, la migración inapropiada de células inmunes o la activación de proenzimas. Esto es relevante si se toma en cuenta que dentro de las manifestaciones graves de la COVID-19 se encuentra la embolia pulmonar, la isquemia intestinal y la vasculitis (inflamación y apoptosis) (Quitadamo et al., 2021).

Es importante mencionar que la evidencia recopilada hasta el momento de estudios en humanos es limitada. Sin embargo, ciertos estudios muestran resultados alentadores en relación con la duración de la infección y la disminución de la gravedad de los síntomas (Einerhand et al., 2022). Por ejemplo, en un estudio observacional prospectivo realizado en 75 pacientes con COVID-19 en España, se demostró que la administración oral de una mezcla de LF liposomal y una solución de zinc durante 10 días dio como resultado la recuperación completa y más rápida de todos los pacientes tratados dentro de los primeros 5 días de tratamiento. Además, se observó que el mismo tratamiento, pero en dosis menores ejercía un potencial efecto preventivo frente a la COVID-19 en personas sanas directamente relacionadas con los afectados (Einerhand et al., 2022; Serrano et al., 2020).

Por otra parte, se sabe que diversas proteínas de la leche materna como la  $\kappa$ -caseína, la lactoadherina, la lisozima, la enzima lactoperoxidasa, los distintos tipos de mucinas, entre otras exhiben propiedades antivirales vistas en diversos estudios con diferentes virus. Sin embargo, no se cuenta aún con estudios específicos para SARS-CoV-2. A pesar de esto, las propiedades antivirales observadas podrían ser de utilidad en el contexto de la COVID-19 (Kaplan et al., 2022).

Por ejemplo, se sabe que la lisozima posee actividad antiviral relacionada con su naturaleza catiónica que permite que esta se adhiera fácilmente a las estructuras de la membrana cargadas negativamente. Se ha observado que la lisozima es eficaz contra el virus del herpes simple, el HIV-1 y el virus varicela zóster. Aunque no se ha estudiado la interacción entre la lisozima y el SARS-CoV-2, se ha demostrado que el tratamiento con aerosol de lisozima disminuye la inflamación, lo que podría ser beneficioso y ayudar con las complicaciones pulmonares relacionadas con la COVID-19. De igual manera la lisozima presente en la leche materna podría presentar efectos beneficiosos como los observados con estos otros virus (Kaplan et al., 2022).

Otra glicoproteína con potencial efecto contra el SARS-CoV-2 es la mucina, que además de encontrarse en la leche materna, es el componente principal de la estructura del moco en el tracto gastrointestinal y respiratorio. Se sabe que la mucina tipo 1 y 4 son las que se encuentran en la leche humana y se ha demostrado que poseen actividad antiviral *in vitro* contra el VIH, el virus de la influenza y otros virus. Estas mucinas ubicadas extracelularmente tienen una región unida a la membrana, un segmento citoplasmático corto y una parte altamente glicosilada. Esta parte glicosilada de las proteínas de la MFGM actúa como receptor señuelo para evitar la unión de patógenos a las células epiteliales (Kaplan et al., 2022).

En un estudio se observó que las mucinas de origen bovino pueden inhibir la infección del coronavirus humano OC43 en células vivas de una manera dependiente de la concentración y la glicosilación. Se determinó que la estructura molecular de la mucina juega un papel complejo e importante en la defensa del hospedador (Kaplan et al., 2022; Wardzala et al., 2022).

Se ha evidenciado que el contenido de mucina en la leche humana y su viscosidad pueden aumentar cuando la madre se infecta con el SARS-CoV-2, lo que podría representar una fuente de protección para el lactante, tomando en cuenta que los virus deben penetrar la capa de moco antes de entrar en la célula y replicarse (Kaplan et al., 2022).

La leche materna posee un sistema antiinflamatorio bien desarrollado que incluye varios factores bioactivos que podrían ayudar a atenuar el estado proinflamatorio observado en la COVID-19; entre ellos los HMOs vistos anteriormente, citocinas antiinflamatorias como la IL-10, entre otros (ver capítulo 2) (Quitadamo et al., 2021).

La IL-10 que se encuentra en la leche materna es un potente antiinflamatorio, capaz de inhibir la actividad de las células efectoras Th1, las células NK y los macrófagos, por lo tanto, inhibe la producción de varias citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, IL -8 y TNF- $\alpha$ , logrando de esta manera atenuar la respuesta inmune. La IL-8 es una citocina proinflamatoria que se encuentra presente de manera significativa en la forma grave de la COVID-19 (Gong et al., 2020; Quitadamo et al., 2021).

Con el proceso inflamatorio en la COVID-19, también se da el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que altera la función de barrera pulmonar y aumenta la permeabilidad vascular. Además, si el síndrome de distrés respiratorio agudo se prolonga o no se resuelve, puede provocar fibrosis. La capacidad antioxidante total de la leche humana incluye el contenido de glutatión peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa,  $\alpha$ -tocoferol, metales traza, entre otros. Los antioxidantes son una parte importante del sistema antiinflamatorio en la leche materna y pueden contrarrestar la producción excesiva de ROS debido a la hipoxia-reperfusión (Mehta & Petrova, 2014; Quitadamo et al., 2021).

#### Anticuerpos presentes en la leche materna contra SARS-CoV-2

Se sabe que los bebés pueden recibir inmunidad pasiva a través de la transferencia de anticuerpos maternos sistémicos por medio de la placenta y anticuerpos mucosos a través de la leche materna. Se cree que los anticuerpos sistémicos proporcionan protección durante 3 a 9 meses, hasta que el lactante es capaz de generar una respuesta inmunológica activa. Los anticuerpos de la leche materna se derivan principalmente de las células B activadas (células

plasmáticas) en la mucosa, lo que genera altas concentraciones de anticuerpos secretores que ofrecen un periodo prolongado de transferencia de inmunidad contra los patógenos que puedan afectar la mucosa del bebé (Pullen et al., 2021).

Se ha evidenciado que la leche materna producida por madres con COVID-19 es una fuente de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 de tipo IgA e IgG que tienen la capacidad de neutralizar la actividad del virus. Por lo que posiblemente exista una protección inmunológica en los recién nacidos (Dong et al., 2020; Pace et al., 2021; Pérez-bermejo et al., 2021).

En un estudio en donde se analizaron 18 muestras de leche materna recolectada de madres infectadas por SARS-CoV-2, se observó que todas las muestras dieron negativo para el ARN del SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real. Además, se encontró la presencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 de tipo IgA e IgG que fueron capaces de neutralizar la infectividad del virus *in vitro*. Por lo que se concluyó que la leche materna producida por madres con COVID-19 es una fuente beneficiosa de anticuerpos con capacidad neutralizante, datos que respaldan la recomendación de continuar con la lactancia materna durante la enfermedad (Pace et al., 2021).

En otro estudio se analizaron las características inmunológicas y la evolución de la enfermedad COVID-19 de cuatro parejas madre-bebé y se encontraron resultados similares. Se trató de un ensayo observacional ambispectivo y de análisis clínico realizado en mujeres embarazadas con COVID-19 que dieron a luz durante la hospitalización. Se tomaron muestras de leche materna dentro de los 7 días posteriores al parto. Se observó por medio de ensayos inmunológicos la seroconversión materna de IgM en el día 8 después del inicio de la enfermedad y de IgG en el día 28 (Gao et al., 2020).

Se evidenció que 3 muestras de leche materna poseían anticuerpos IgM o IgG contra el SARS-CoV-2. Tres recién nacidos dieron positivo para IgG contra SARS-CoV-2 y uno dio positivo para IgM dentro de las 24 h posteriores al nacimiento. Parte de las conclusiones del estudio es que en la leche materna se pueden encontrar anticuerpos contra el SARS-CoV-2, debido a esto se recomienda continuar con la lactancia manteniendo las debidas precauciones para que los bebés puedan beneficiarse de la adquisición directa de estos anticuerpos.

Además, tampoco se encontró el genoma del virus en la leche materna, esto indica que la leche posee un bajo riesgo de transmisión viral (Gao et al., 2020).

En otros estudios realizados con madres que recibieron la vacuna de ARNm del SARS-CoV-2, se encontró una alta secreción de anticuerpos IgA, IgM e IgG contra el SARS-CoV-2 en la leche materna durante seis semanas después de la vacunación (Gray et al., 2021; Pérez-bermejo et al., 2021; Perl et al., 2021).

En uno de los estudios en donde se trabajó con mujeres en etapa de lactancia, se encontraron los 3 tipos de anticuerpos (IgA, IgM e IgG) en todas las muestras de leche materna de las madres vacunadas con Pfizer/BioNTech y Moderna (Ambas vacunas usan ARNm para administrar el antígeno de la proteína S del SARS-CoV-2 al sistema inmunológico). Se observó que tras recibir la segunda dosis de la vacuna hubo un aumento de IgG específica para el SARS-CoV-2 pero no de IgA. Además, se observó la transferencia inmunológica a los recién nacidos a través de la leche materna. Por lo que se concluye que las vacunas de ARNm contra la COVID-19 generan una respuesta humoral robusta en mujeres en etapa de lactancia y que la inmunidad se transfiere a los neonatos través de la placenta y la leche materna (Gray et al., 2021).

Mientras que la IgA predomina en la leche materna después de la infección natural por SARS-CoV-2, la IgG predomina después de la vacunación, lo que refleja las diferencias en la programación del perfil de anticuerpos en la mucosa adquirida durante la infección natural por SARS-CoV-2 frente a la vacunación intramuscular (Zheng et al., 2022).

En el otro estudio de cohorte prospectivo realizado de igual manera con madres en etapa de lactancia y que recibieron 2 dosis de la vacuna Pfizer-BioNTech, se encontraron anticuerpos IgA en el 86,1% de las muestras de leche materna e IgG en el 97% de las muestras. Si bien no se realizaron ensayos funcionales para los anticuerpos, los autores mencionan que se ha visto en otros estudios que estos anticuerpos detectados tienen capacidad neutralizante del virus, lo que sugiere un posible efecto protector contra la infección en el lactante (Perl et al., 2021).

La función de los anticuerpos que se encuentran en la leche materna de madres infectadas con SARS-CoV-2 en lactantes no se ha estudiado específicamente. En la mayoría de los estudios donde se analiza la leche materna, los distintos autores realizan recomendaciones para futuros investigadores sobre estudiar no solo la presencia de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 en la leche humana, sino también la maduración, la afinidad y funcionalidad de estos anticuerpos. Esta limitación está presente no solo en estudios de madres que han tenido la enfermedad, sino también en aquellos en los que se ha analizado la leche materna de madres vacunadas contra el SARS-CoV-2 (Pérez-bermejo et al., 2021).

Además, en los estudios en los que se ha demostrado la capacidad de los anticuerpos para neutralizar el virus, se han realizado *in vitro*. Por lo que no se ha podido estudiar el impacto que pueden tener los anticuerpos en el lactante (Pérez-bermejo et al., 2021).

Son pocos los estudios que analizan la funcionalidad de los anticuerpos transferidos a través de la leche materna. Por ejemplo, un estudio realizado *in vitro*, con muestras de suero y leche materna de madres previamente infectadas con el SARS-CoV-2, se aplicó el método de serología de sistemas para caracterizar los anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 en estos fluidos y ver sus características funcionales (Pullen et al., 2021).

Se observaron distintas respuestas de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 en el suero y la leche materna de las madres. Se evidenció una transferencia más dominante en leche materna de IgA e IgM y la presencia de IgG, pero en menor cantidad y funcionalmente atenuada. Particularmente se observó la transferencia preferencial de anticuerpos capaces de provocar la fagocitosis mediada por neutrófilos y neutralización en comparación con otras funciones (como la activación de las células NK) (Pullen et al., 2021).

Por otra parte, se observaron mayores niveles de todos los isotipos de inmunoglobulinas en el suero materno. Además, se evidenció una funcionalidad más robusta de estos, ya que fueron capaces de inducir mayores niveles de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos, fagocitosis mediada por neutrófilos, activación de células NK (respuesta más agresiva), activación del complemento y neutralización (Pullen et al., 2021).

La fagocitosis mediada por anticuerpos se puede llevar a cabo por medio de la IgA y la IgG, la neutralización por cualquier isotipo de inmunoglobulina y la activación de células NK sólo es inducida por la IgG. Esto sugiere la omisión de la IgG altamente inflamatoria en la leche materna en la infección natural por SARS-CoV-2. Estos datos destacan la transferencia preferencial de IgA e IgM específicas de SARS-CoV-2 a la leche materna, acompañadas de subpoblaciones de IgG seleccionadas, posicionadas para crear una barrera protectora no patológica contra la COVID-19. Sin embargo, se deben realizar más investigaciones para comprender el papel de los anticuerpos funcionales tanto en la leche materna como en las superficies mucosas (Pullen et al., 2021).

En un estudio en donde se evaluó la dinámica de la respuesta inmune al SARS-CoV-2 en 2 mujeres que estaban amamantando, se evaluaron muestras de leche materna y suero durante 6 meses después de la infección en busca de anticuerpos específicos para la región RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Se encontraron anticuerpos IgA que fueron persistentes durante 6 meses en la leche materna y niveles estables de IgG en el suero materno durante ese mismo periodo de tiempo. Si bien el estudio no fue diseñado para evaluar el nivel de protección que la IgA materna puede conferir al bebé durante periodos prolongados de tiempo, los patrones de protección encontrados en otros virus respiratorios (por ejemplo, influenza y VRS) sugieren que esto confiere inmunidad pasiva efectiva. La protección contra la infección por SARS-CoV-2 no se ha establecido (Duncombe et al., 2021; Pérez-bermejo et al., 2021).

#### Transmisión del SARS-CoV-2 a través de la leche materna y mantenimiento de la lactancia materna

Al inicio de la pandemia en el 2020 surgió la pregunta de si mantener la lactancia materna sería una práctica segura para el lactante, por lo que se fueron efectuando estudios sobre el impacto del SARS-CoV-2 en la lactancia materna (Pérez-bermejo et al., 2021; Zheng et al., 2022).

En varios estudios se ha analizado el calostro de madres positivas para SARS-CoV-2 por medio de técnicas de diagnóstico molecular como PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos no evidenciaron la presencia del ARN del SARS-CoV-2 en ninguna de las

muestras de leche materna en las primeras horas después del parto, posterior a la primera toma del neonato. Ningún bebé desarrolló síntomas de COVID-19 ni dio positivo por el virus (Gabriel et al., 2020; Liu et al., 2020; Pérez-bermejo et al., 2021; Salvatori et al., 2020).

Esta idea de la baja probabilidad que existe de transmisión del virus de la madre al recién nacido concuerda con otros estudios en los que las muestras de leche materna tampoco contenían el ARN del SARS-CoV-2, por lo que se refuerza el hecho de que el riesgo de transmisión es bajo (Chu et al., 2020; Fan et al., 2021; Pérez-bermejo et al., 2021).

Existen pocos estudios en donde sí se pudo encontrar la presencia del ARN del SARS-CoV-2 en ciertas muestras de leche materna (no en todas). Sin embargo, la recolección de la leche se hizo mediante extractor eléctrico o no se reportó el método de recolección, por lo que no quedó claro si la presencia del virus fue debido a la contaminación con las secreciones respiratorias maternas (Groß et al., 2020; Pérez-bermejo et al., 2021; Zhu et al., 2020). Además, en los estudios que se ha detectado el ARN viral, no se ha observado ningún virus con capacidad de replicación (Chambers et al., 2020; Pérez-bermejo et al., 2021).

Debido a estos hallazgos, diversos estudios coinciden en que se debe fomentar la lactancia materna tanto directa como diferida (leche extraída), cuando la madre está infectada por el virus y el neonato no, siempre que se tomen las medidas necesarias para evitar el contagio por secreciones respiratorias de la madre. Ciertos estudios, además de fomentar la lactancia materna, argumentan que esta desempeña un papel protector frente a la enfermedad COVID-19, dado la posible inducción de inmunidad pasiva por medio de los anticuerpos maternos (Chu et al., 2020; Gabriel et al., 2020; Pérez-bermejo et al., 2021; Vassilopoulou et al., 2021).

La OMS, el Fondo Internacional de Emergencia para la Infancia de las Naciones Unidas (UNICEF), la Unión Europea de Sociedades Neonatales y Perinatales (UENPS) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, han concordado en alentar la lactancia materna durante la pandemia, haciendo énfasis en los múltiples beneficios a largo plazo de la lactancia materna (Pérez-bermejo et al., 2021; Vassilopoulou et al., 2021).

Las recomendaciones indican que no hay pruebas suficientes que demuestren que la COVID-19 se transmite a través de la leche materna. Se deben evitar las medidas estrictas de separación entre madre e hijo y la interrupción de la lactancia materna, esto de manera independiente de un diagnóstico positivo, a menos que la gravedad de la enfermedad no le permita a la madre cuidar de su bebé. En ese caso se debe dar al bebé leche fresca sin pasteurizar (Pérez-bermejo et al., 2021; Vassilopoulou et al., 2021).

Las medidas que se deben tomar para minimizar el riesgo de transmisión durante la lactancia incluyen el uso de mascarilla, el lavado frecuente de manos, la limpieza y esterilización de los recipientes utilizados para la alimentación del bebé antes y después de su uso, el lavado de los senos con agua y jabón y evitar dormirse con el bebé. Si lo anterior no es posible, también se recomienda extraer la leche materna y que el bebé sea alimentado por un familiar o cuidador sano (Pérez-bermejo et al., 2021; Vassilopoulou et al., 2021).

## Discusión

Las infecciones por microorganismos patógenos son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en neonatos, debido a que su sistema inmune y la mucosa de las vías respiratorias y gastrointestinales en general son inmaduras. La leche materna provee protección contra estas infecciones e induce la maduración del sistema inmune y del tracto gastrointestinal del bebé por medio de los factores bioactivos que posee (Ballard & Morrow, 2013; Cheng et al., 2021; Morrin et al., 2021; Telang, 2018).

En este trabajo se exponen los principales componentes bioactivos de la leche materna y sus propiedades antiinfecciosas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias que ayudan al neonato a la prevención de infecciones y al desarrollo de su sistema inmune. Se discuten los 3 mecanismos de acción principales de estos factores para llevar a cabo la protección del bebé (Morrin et al., 2021).

En primer lugar, se estudia el mecanismo de receptor señuelo, de vital importancia para impedir la colonización de microorganismos patógenos que utilizan las mucosas como vía de entrada (Morrin et al., 2021). Es importante destacar que no todos los componentes bioactivos de la leche materna ejercen este mecanismo. Sin embargo, los que lo llevan a cabo representan una barrera importante en el paso fundamental de los agentes patógenos para adherirse al epitelio intestinal, invadir y colonizar al hospedador.

Los oligosacáridos de la leche materna son uno de los principales componentes que actúan a través de este mecanismo, debido a que presentan estructuras moleculares similares a los receptores de membrana requeridos por ciertos microorganismos patógenos para ingresar a las células epiteliales intestinales. Entre ellos los causantes más comunes de diarreas en niños como *Campylobacter jejuni* y norovirus. Además, hay otros microorganismos causantes de infecciones invasivas en neonatos como *Streptococcus agalactiae*. Los HMOs también podrían de manera hipotética representar un factor protector en la infección por SARS-CoV-2 al impedir la entrada viral. Los HMOs presentan semejanzas con las estructuras que el virus necesita para ingresar a las células del hospedador (Ackerman et al., 2017; Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b; Cheng et al., 2021).

Otros componentes de la leche materna también ejecutan este mecanismo. Los glicosaminoglicanos también previenen la adhesión de microorganismos patógenos a la célula blanco (ejemplo, EPEC, VIH-1). Además de proteínas como la  $\kappa$ -caseína, componentes de la MFGM como los gangliósidos (GM3 y GM1), y glicoproteínas como MUC1 y MUC4. Lo que señala que es un mecanismo bastante utilizado (Burge et al., 2019; Brink & Lönnerdal, 2020; Lee Padhi et al., 2018; Lönnerdal, 2016; Morrin et al., 2021).

Dentro de este mecanismo se contempla la unión directa de los componentes de la leche materna a los microorganismos ya sea para neutralizarlos (como en el caso de las inmunoglobulinas), para opsonizarlo y provocar su fagocitosis, o para modificar las características fisicoquímicas del microorganismo y provocar su muerte (Morrin et al., 2021).

Por ejemplo, la LF que puede actuar directamente contra bacterias Gram positivas y Gram negativas por medio de péptidos derivados de su digestión. También puede actuar directamente contra proteínas de envoltura viral (VHC), lo que previene la infección (Berlutti et al., 2011; Liu et al., 2019). Otras proteínas también poseen un efecto antibacteriano directo como la lisozima, la xantina oxidoreductasa, la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la osteopontina. Además de lípidos como El DHA y el GML (Layman et al., 2018; Lee, Padhi et al., 2018; Lönnerdal, 2017; Morrin et al., 2021; Schack et al., 2009).

Otro mecanismo realizado por ciertos componentes de la leche materna es la inhibición competitiva, que no se estudia como un apartado puesto que no es muy común. Por ejemplo, la lactoferrina y la MUC1 que se unen a los HSPGs presentes en la superficie celular de las células hospedadoras necesarios para el ingreso de algunos patógenos, como es el caso del herpes simple y el SARS-CoV-2 (Kaplan et al., 2022; Morrin et al., 2021; Telang, 2018).

Los factores bioactivos de la leche materna pueden promover la protección contra agentes infecciosos al modular la superficie celular del tracto gastrointestinal inmaduro del bebé, con el fin de incrementar la función de barrera intestinal y promover la maduración del intestino (Morrin et al., 2021). La importancia de este mecanismo se puede evidenciar, al observar que varios componentes bioactivos de la leche materna lo llevan a cabo.

Un ejemplo importante son los HMOs, que aumentan la multiplicación de las células epiteliales intestinales en condiciones inflamatorias, modifican la expresión génica de enzimas para modificar azúcares en la superficie celular y disminuir la adherencia de patógenos. Además, incrementan la expresión de ciertas proteínas protectoras como la mucina y modulan el desarrollo del glicocáliz intestinal que apoya la función de barrera de la mucosa. También podrían interferir en la señalización inflamatoria de la mucosa en los eventos observados en la COVID-19 (Angeloni et al., 2005; Chutipongtanate et al., 2022; Kong et al., 2019; Wang et al., 2019; Wu et al., 2019).

Otros componentes de la leche materna también llevan a cabo la modulación celular. Pueden participar como mensajeros en la transducción de señales, transporte, crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y comunicación celular. Procesos que facilitan la maduración enzimática y morfológica del intestino inmaduro del recién nacido. Por ejemplo, los lípidos y proteínas presentes en la MFGM, la lactoferrina, la osteopontina y los GAGs (Aksan et al., 2021; Donovan et al., 2014; Hill et al., 2013; Lee, Padhi et al., 2018; Liu et al., 2019; Thum et al., 2022; Woo et al., 2019).

Por otra parte, los factores bioactivos de la leche materna pueden interactuar directamente con el sistema inmune inmaduro del bebé, promoviendo su educación y maduración. Aspecto fundamental para la defensa contra patógenos, inducción de tolerancia oral y regulación de las respuestas inmunes como la atenuación de la inflamación. Además, pueden mejorar la respuesta inmune de los leucocitos presentes en el intestino del bebé y en la misma leche materna (Morrin et al., 2021).

La inmunomodulación es un mecanismo muy común realizado por la mayoría de los componentes bioactivos de la leche materna y es de suma importancia. Este mecanismo lo llevan a cabo varios factores como los HMOs que muestran efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores al unirse a la superficie de las células inmunes. Están involucrados en la maduración de células dendríticas y de forma hipotética podrían participar en la producción de IFN tipo I para promover un estado antiviral contra el SARS-CoV-2. Los GAGs por su parte, previenen una respuesta inmunológica exacerbada y el daño intestinal posterior (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019b; Chutipongtanate et al., 2022; Kaplan et al., 2022; Morrin et al., 2021).

La  $\alpha$ -lactoalbúmina mejora la respuesta inmune innata al estimular la actividad fagocítica de macrófagos. La lactoferrina posee actividad antiinflamatoria, puede modular la respuesta inmune innata y adaptativa en las infecciones y mejora la respuesta inflamatoria para la eliminación del SARS-CoV-2. La osteopontina se une a integrinas en la superficie celular para iniciar cascadas de señalización y contribuye en los procesos de inmunidad innata como la fagocitosis en macrófagos. Proteínas de la MFGM como la BTN y la lactoadherina también tienen participación en la regulación de las respuestas inmunológicas. La BTN regula la actividad de las células T y la lactoadherina participa en la atenuación de la inflamación intestinal (Aksan et al., 2021; Lee, Padhi et al., 2018; Lönnnerdal, 2014; Morrin et al., 2021; Quitadamo et al., 2021; Schack et al., 2009).

Los lípidos de la leche materna como los PUFA omega-3 también participan en esta inmunomodulación, ya que inhiben la inducción de genes inflamatorios y afectan el equilibrio entre distintas células del sistema inmune adaptativo. El DHA es un importante inmunomodulador que regula la producción de citocinas inflamatorias, leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos. Los gangliósidos de la MFGM pueden modular la producción de citocinas y la activación de linfocitos, además de promover la tolerancia a antígenos que no son dañinos. La IL-10 es un potente antiinflamatorio capaz de atenuar la inflamación en eventos patogénicos de la COVID-19 (Lee, Padhi et al., 2018; Morrin et al., 2021; Quitadamo et al., 2021; Zheng et al., 2022).

La SIgA también contribuye en gran medida en la modulación y la educación inmune del recién nacido. La leche materna es la integración inmunológica entre la madre y el lactante. La madre puede pasar su “archivo inmunológico” al bebé por medio de anticuerpos (principalmente IgAS) con especificidades hacia antígenos comensales y patógenos. Esto contribuye a la educación inmunológica y a la tolerancia oral en las primeras etapas de la vida. Aspecto fundamental para prevenir alergias, como en el caso de la alergia a las proteínas de la leche de vaca (Atyeo & Alter, 2021).

Después de estudiar los mecanismos de acción de los componentes bioactivos de la leche materna, se puede concluir que estos no se limitan a actuar bajo un solo mecanismo, sino que la combinación de todos da un efecto sinérgico que lleva a un mismo objetivo: la defensa

contra patógenos, la maduración del sistema gastrointestinal y el sistema inmune que se encuentran inmaduros en las primeras etapas de la vida.

Es importante mencionar, que el papel biológico y los mecanismos exactos de acción de ciertos componentes bioactivos de la leche materna no se comprenden del todo. Este es el caso de la osteopontina, el DHA, el GML y el papel de varias citocinas (Aksan et al., 2021; Christensen et al., 2020). Esto abre camino para nuevas investigaciones y la mejora de las fórmulas lácteas infantiles. Además, indica la variedad de funciones y mecanismos complejos desempeñados por la leche materna.

La microbiota intestinal sana proporciona distintos beneficios para la salud al controlar la homeostasis intestinal y colaborar con la modulación de las respuestas del sistema inmune. La leche materna tiene una microbiota única y es una de las principales fuentes de bacterias en el intestino del bebé (Chutipongtanate et al., 2022; Thai & Gregory, 2020).

Un mecanismo que no está descrito como tal en la literatura, pero que en definitiva forma parte de los mecanismos de acción llevados a cabo por los componentes bioactivos de la leche materna, es el fortalecimiento de la microbiota intestinal del lactante. Este sería un mecanismo de tipo indirecto, ya que, al verse favorecidas ciertas poblaciones microbianas beneficiosas por medio de estos factores, se estaría contribuyendo a fortalecer la barrera que impide el paso de patógenos. Además de mejorar las respuestas inmunes y la maduración celular del tracto gastrointestinal del bebé.

Diversos componentes bioactivos de la leche materna contribuyen en este aspecto. Por ejemplo, los oligosacáridos que son fermentados por bacterias beneficiosas, cuyos productos de fermentación mejoran la función de barrera intestinal. Además, el fortalecimiento de la microbiota intestinal puede ser beneficioso en la disbiosis intestinal que se presenta en los pacientes con COVID-19 (Chutipongtanate et al., 2022; Morrin et al., 2021).

Otros componentes de la leche materna también contribuyen en la selección de la microbiota intestinal sana. Los GAGs, la  $\kappa$ -caseína (promueve el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum*), la  $\alpha$ -lactoalbúmina (por medio de péptidos derivados de su hidrólisis), la lactoferrina (al ser un donante de hierro para el crecimiento de bacterias como *Lactobacillus*

*sp*) y la SIgA. Además de lípidos como los PUFAs omega-3, el GML y los gangliósidos (Atyeo & Alter., 2021; Fukuda et al., 2011; Hendricks & Guo, 2021; Lee et al., 2018; Lee, Padhi et al., 2018; Liu et al., 2021; Lönnerdal, 2014; Morrin et al., 2021; Xu et al., 2022).

Un aspecto interesante de analizar es el hecho de que los componentes bioactivos de la leche materna van cambiando de acuerdo con una multitud de factores. La etapa de lactancia en la que la madre se encuentre y el tipo de leche que se esté produciendo en ese momento refleja las necesidades cambiantes inmunológicas y de crecimiento del bebé.

Las diferencias son marcadas si se compara el calostro con la leche madura. Por ejemplo, componentes específicos como los GAGs se encuentran en mayor concentración en las 2 primeras semanas después del parto. La xantina oxidoreductasa alcanza su punto máximo durante las primeras semanas de lactancia como medida de protección para el intestino inmaduro del bebé. Además, otros componentes se encuentran de igual manera aumentados en el calostro como la lactoferrina, las inmunoglobulinas secretoras (SIgA y SIgM), cierto tipo de oligosacáridos (2'FL), la IL-10 y los gangliósidos como el GD3 que es fundamental en las primeras etapas del bebé para el establecimiento de la tolerancia oral (Gila-Díaz et al., 2019; Lee, Padhi et al., 2018; Morrin et al., 2021; Quitadamo et al., 2021; Thai & Gregory, 2020).

Al inicio de la vida el bebé es más vulnerable y su sistema inmune y gastrointestinal se encuentra en su punto de mayor inmadurez, es más propenso a las infecciones. Estos cambios en la concentración de los distintos componentes de la leche materna reflejan esa relación entre la necesidad del lactante y la producción de los factores que necesita para la defensa adecuada y la inducción de maduración.

Por otra parte, la leche materna es un fluido tan dinámico que también puede variar según momentos específicos en que se necesite. Por ejemplo, cuando se está ante un desafío como una infección causada por un microorganismo patógeno. En este caso las proteínas implicadas en la defensa como la lactoferrina y las inmunoglobulinas aumentan. La composición de las proteínas de la MFGM puede fluctuar durante estos desafíos aumentando las proteínas implicadas en la defensa del hospedador y disminuyendo las que corresponden al metabolismo de las grasas (Addis et al., 2011; Quitadamo et al., 2021; Riskin et al., 2012).

La leche materna también puede lograr un equilibrio entre los sistemas inflamatorios y antiinflamatorios dependiendo de las condiciones que lo requieran. Como es el caso de las madres que tienen bebés prematuros. En este caso la leche materna tiene una menor concentración de citocinas proinflamatorias en comparación con la leche de los bebés nacidos a término. Lo que sugiere que la leche materna regula la inflamación intestinal y se adapta a las necesidades particulares del sistema inmune de cada bebé (Thai & Gregory, 2020).

Otro ejemplo interesante de este cambio dinámico se observa en los oligosacáridos de la leche materna. Hay una disminución de estos en la leche madura en comparación con el calostro. Sin embargo, este no es un cambio uniforme, ya que mientras ciertos tipos de oligosacáridos disminuyen, otros aumentan y lo hacen a velocidades diferentes. Además, las distintas mezclas de los oligosacáridos pueden dar lugar a diferentes tipos de modulación inmune, ya sea para activar o inhibir mecanismos. Nuevamente reflejando los cambios en la composición de la leche según la necesidad de la glándula mamaria o el lactante (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021).

Otras variables que pueden modificar la composición de la leche materna son: la genética materna, la edad gestacional, la dieta materna, el medio ambiente, la composición corporal, el estado de salud materno, entre otros. Factores bioactivos como los oligosacáridos, las citocinas y la composición del glóbulo de grasa lácteo se pueden ver modificados por estos (Cheng et al., 2021; Gila-Diaz et al., 2019; Lee, Padhi et al., 2018).

Otro aspecto importante para discutir es el recurso que se utiliza para realizar las investigaciones sobre los componentes de la leche materna. Para poder evaluar el papel y las funciones de los componentes bioactivos de la leche materna, se han utilizado modelos celulares, distintos animales de experimentación, leche de diferentes especies y sobre todo leche bovina. En algunos casos tomando en cuenta la homología que presentan ciertas proteínas de la leche humana con la bovina o partiendo de la hipótesis de que ocurran fenómenos similares con la leche humana. Aunque no queda claro si realmente tiene implicaciones para el lactante (Lönnerdal, 2017; Thum et al., 2022).

Esto se ha llevado a cabo principalmente porque los factores bioactivos de la leche materna no siempre están disponibles comercialmente o en grandes cantidades. Además, no es tan

sencillo realizar investigaciones en seres humanos sobre todo cuando se trata de bebés, aunque sí se han realizado pocos estudios. Sobre todo, para comparar los beneficios observados en bebés alimentados con leche materna versus los que son alimentados con fórmula láctea infantil (Lönnerdal, 2017; Thum et al., 2022).

Es importante mencionar que, aunque ciertas proteínas y componentes de la leche bovina tienen altos grados de homología con los componentes de la leche materna y podrían tener bioactividades similares, no son iguales. Esto hace pensar que su función no es exactamente igual que en la leche materna y en el organismo del lactante.

Por otra parte, las concentraciones de ciertos componentes bioactivos en la leche bovina son más bajas en comparación con la leche materna. Como es el caso de los oligosacáridos, los GAGs (concentración 7 veces menor en la leche bovina), la osteopontina, la lisozima (3000 veces menor en leche bovina), la esfingomiélin, los gangliósidos y el GML; que incluso se encuentra ausente en las fórmulas infantiles industriales (Lee, Padhi et al., 2018; Lönnerdal, 2016, 2017; Morrin et al., 2021; Schlievert et al., 2019).

La variabilidad de las moléculas también cambia en la leche bovina respecto a la leche materna. Por ejemplo, se han descubierto y caracterizado alrededor de 200 moléculas diferentes de oligosacáridos en la leche materna. Cada madre puede sintetizar hasta 65 moléculas diferentes. En cambio, la leche bovina tiene una menor variedad y concentraciones mucho más bajas de estos. Además, ciertas moléculas que se han utilizado para sustituir o tratar de igualar a los oligosacáridos de la leche materna no son estructuralmente iguales por lo que las bioactividades tampoco lo serán (Brunser Tesarschü & Brunser Tesarschü, 2019a; Cheng et al., 2021; Morrin et al., 2021).

Esta información demuestra la importancia de alimentar a los bebés con leche materna, ya que es un fluido especialmente diseñado para ellos, con las concentraciones correctas para el adecuado desarrollo y defensa inmunológica en esa etapa.

Respecto a los anticuerpos presentes en la leche materna contra el SARS-CoV-2, se ha observado en diversos estudios que la leche de madres enfermas con COVID-19 es una fuente de todos los isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgM e IgG). Además, estos anticuerpos

tienen la capacidad de neutralizar el virus *in vitro*. También se ha observado la presencia de estas inmunoglobulinas en madres que han recibido la vacuna de ARNm del SARS-CoV-2. Estas mujeres son capaces de transmitir estos anticuerpos a través de la placenta en el caso de mujeres embarazadas y a través de la leche materna (Dong et al., 2020; Gao et al., 2020; Gray et al., 2021; Pace et al., 2021; Pérez-bermejo et al., 2021; Perl et al., 2021).

Es importante destacar que se necesitan más estudios para evaluar no sólo la presencia de los anticuerpos en la leche materna contra el SARS-CoV-2, sino también su funcionalidad, afinidad y sobre todo sus efectos en la salud del lactante. Las pocas investigaciones realizadas se han hecho *in vitro*. Además, se necesitan más investigaciones sobre la dinámica del título de anticuerpos en la leche materna y su duración después de la infección por SARS-CoV-2 (Pérez-bermejo et al., 2021).

Con el estudio realizado *in vitro* para evaluar la interacción de los anticuerpos de la leche materna con otras células inmunes (capítulo 3) (Pullen et al., 2021) queda en evidencia que la leche materna es un sistema dinámico, que se adapta a las necesidades de inmadurez inmunológica e intestinal del neonato. Debido a que en la leche materna se seleccionaron subpoblaciones de anticuerpos capaces de neutralizar el SARS-CoV-2 pero a la vez, se encontró menos cantidad de anticuerpos capaces de provocar una respuesta más agresiva en el tracto gastrointestinal del bebé.

En cuanto a la transmisión del virus a través de la leche materna, varios estudios no encontraron la presencia del ARNm del SARS-CoV-2 en las muestras de leche materna. En los pocos estudios en donde sí se encontró, no quedó claro si fue por contaminación con las secreciones respiratorias de la madre. Además, no se encontró ningún virus con capacidad de replicación. Por estas razones se sugiere que el riesgo de transmisión a través de la leche materna es muy bajo (Chambers et al., 2020; Chu et al., 2020; Fan et al., 2021; Gabriel et al., 2020; Liu et al., 2020; Pérez-bermejo et al., 2021; Salvatori et al., 2020; Zhu et al., 2020).

Esta información puede llevar a la hipótesis de que los mismos componentes bioactivos de la leche materna son capaces de neutralizar el virus que llega a la leche por contaminación con secreciones de la madre.

Debido a estos hallazgos, la recomendación en varios estudios, así como de organizaciones internacionales es fomentar la lactancia materna aun cuando la madre está infectada pero el neonato no. Se deben seguir las medidas estrictas para evitar el contagio del bebé por medio de las secreciones respiratorias de la madre, como el uso de mascarilla, el lavado adecuado de manos, entre otros. Además, en el caso de que la madre no pueda amamantar a su bebé por la gravedad de la enfermedad, se recomienda dar leche materna extraída (Chu et al., 2020; Gabriel et al., 2020; Pérez-bermejo et al., 2021; Vassilopoulou et al., 2021).

Actualmente varias investigaciones sobre el SARS-CoV-2, la COVID-19 y los componentes bioactivos de la leche materna se encuentran en desarrollo, queda esperar resultados y más investigación científica para ir comprendiendo de mejor manera los mecanismos implicados en la defensa del lactante y el impacto que estos generan en su salud.

## Conclusiones

En etapas tempranas de la vida el tracto gastrointestinal y el sistema inmune del lactante son inmaduros. Esto los hace vulnerables frente a microorganismos patógenos causantes de infecciones. Necesitan de la influencia de los componentes bioactivos de la leche materna para poder desarrollar estos sistemas adecuadamente y poder promover la defensa inmunológica.

Los componentes bioactivos de la leche materna ejercen su función a través de diferentes mecanismos como receptor señuelo, la modulación celular y la inmunomodulación. Sin embargo, no se limitan a un único modo de acción, sino que la combinación de ellos da como resultado el objetivo primordial: la defensa del neonato y la maduración de su sistema inmune y gastrointestinal.

Existe un cuarto mecanismo llevado a cabo por los componentes bioactivos de la leche materna: el fortalecimiento de la microbiota intestinal del lactante. La leche materna no sólo aporta bacterias beneficiosas para el tracto gastrointestinal del bebé, también aporta componentes que son capaces de modular esta microbiota. Esto contribuye a la maduración del sistema inmune.

El modo de acción de algunos componentes bioactivos de la leche materna es complejo y no se conoce actualmente. Esto abre caminos para la investigación con el fin de dilucidar estos mecanismos en la prevención de infecciones y de esta manera mejorar las fórmulas lácteas infantiles.

La leche materna es un fluido único, dinámico, que cambia bajo muchas variables. Pueden ser maternas (dieta, genética, etc) y según las necesidades cambiantes del bebé. Cambia según la etapa de lactancia, eventos particulares como infecciones o necesidades especiales del bebé (prematuros). Esto con el fin de promover la protección contra agentes patógenos e incentivar la maduración del sistema inmune y el tracto gastrointestinal.

La lactancia materna es una integración muy ingeniosa entre el sistema inmune de la madre y el bebé. La madre pasa su información inmunológica al bebé por medio de anticuerpos con especificidades hacia antígenos comensales y patógenos. Esto educa el sistema inmunológico inmaduro del bebé.

La variabilidad de los componentes bioactivos y la concentración de estos es mayor en la leche materna en comparación con la leche bovina. Además, aunque los factores bioactivos de la leche bovina posean un alto grado de homología con los de la leche materna, no son iguales, lo que respalda el hecho de que la lactancia materna siempre será la mejor opción para el lactante.

Los componentes bioactivos de la leche materna actúan sinérgicamente y mediante interacciones complejas. El consumo de leche materna siempre será superior a la suplementación con los factores individuales en la fórmula láctea infantil. Sin embargo, no se debe dejar de trabajar para mejorar la fórmula infantil para que todos los bebés tengan el mejor comienzo de vida, independientemente de si su madre decide o puede amamantar.

Los componentes bioactivos de la leche materna son capaces de realizar funciones hipotéticas sobre los eventos patogénicos reconocidos y descritos en la enfermedad COVID-19. Sin embargo, es un campo de estudio que se encuentra actualmente en desarrollo. Esto podría proporcionar modelos para nuevos enfoques preventivos y terapéuticos.

Se ha observado la presencia de todos los isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG) en la leche materna de madres infectadas con SARS-CoV-2, capaces de neutralizar el virus *in vitro*. Lo que sugiere una posible protección para el lactante.

Las vacunas de ARNm contra la COVID-19 generan una respuesta humoral robusta en mujeres en etapa de lactancia. La inmunidad se transfiere a través de la placenta en el caso de las mujeres embarazadas y por medio de la leche materna a los neonatos.

Se necesitan más estudios sobre la funcionalidad de los anticuerpos contra el SARS-CoV-2 y su efecto directo en el lactante.

La transmisión del SARS-CoV-2 se da principalmente por el contacto del bebé con las secreciones respiratorias de la madre. No se ha detectado ningún virus con capacidad de replicación en la leche materna, la posibilidad de transmisión por este medio es muy baja.

Cuando la madre se encuentre enferma por COVID-19, la recomendación es continuar con la lactancia materna con los debidos protocolos de seguridad (uso de mascarilla, lavado de manos, lavado de utensilios, etc). Cuando la madre no pueda amamantar a su bebé se recomienda dar leche materna extraída. Los beneficios que el bebé puede obtener de la leche materna siempre serán superiores al riesgo en este caso.

Por todas las razones expuestas anteriormente y debido a la gran cantidad de beneficios que la leche materna aporta, es necesario incentivar campañas de información dirigidas a profesionales de la salud y a madres que se encuentren en esta etapa, con el fin de aumentar la prevalencia de la lactancia materna durante los primeros 6 meses hasta los 2 años de edad o más de los bebés.

Como sugerencia se podrían implementar y ampliar más programas de educación sobre la lactancia materna en todos los centros de salud del país, para que las mujeres embarazadas y las que se encuentran en lactancia puedan acudir e informarse adecuadamente.

Se necesitan más campañas de divulgación sobre este tema y ayuda por parte de los profesionales en salud (enfermería, pediatría, etc). En muchas ocasiones las madres no amamantan a sus hijos por desconocimiento de los beneficios de la leche materna y por problemas en la técnica de amamantamiento que les produce dolor y molestia. El establecimiento de una lactancia materna exitosa se logra con el acompañamiento profesional adecuado (asesorías de lactancia), el conocimiento de los beneficios de la leche materna y, sobre todo, el empoderamiento de las madres en saber que la naturaleza las ha dotado de este único y maravilloso fluido especialmente diseñado para las necesidades de su bebé.

## Referencias

- Abdelhamid, A. E., Chuang, S. L., Hayes, P., & Fell, J. M. E. (2013). Evolution of in vitro cow's milk protein-specific inflammatory and regulatory cytokine responses in preterm infants with necrotising enterocolitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(1), 5–11. <https://doi.org/10.1097/MPG.0B013E31826EE9EC>
- Ackerman, D. L., Craft, K. M., Doster, R. S., Weitkamp, J. H., Aronoff, D. M., Gaddy, J. A., & Townsend, S. D. (2018). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Human Milk Oligosaccharides against *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*. *ACS Infectious Diseases*, 4(3), 315–324. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.7B00183>
- Ackerman, D. L., Doster, R. S., Weitkamp, J. H., Aronoff, D. M., Gaddy, J. A., & Townsend, S. D. (2017). Human Milk Oligosaccharides Exhibit Antimicrobial and Antibiofilm Properties against Group B *Streptococcus*. *ACS Infectious Diseases*, 3(8), 595–605. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.7B00064>
- Actor, J., Hwang, S.-A., & Kruzel, M. (2009). Lactoferrin as a natural immune modulator. *Current Pharmaceutical Design*, 15(17), 1956–1973. <https://doi.org/10.2174/138161209788453202>
- Addis, M. F., Pisanu, S., Ghisaura, S., Pagnozzi, D., Marogna, G., Tanca, A., Biosa, G., Cacciotto, C., Alberti, A., Pittau, M., Roggio, T., & Uzzau, S. (2011). Proteomics and pathway analyses of the milk fat globule in sheep naturally infected by *Mycoplasma agalactiae* provide indications of the in vivo response of the mammary epithelium to bacterial infection. *Infection and Immunity*, 79(9), 3833–3845. <https://doi.org/10.1128/IAI.00040-11>
- Agarwal, S., Karmaus, W., Davis, S., & Gangur, V. (2011). Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *Journal of Human Lactation : Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 27(2), 171–186. <https://doi.org/10.1177/0890334410395761>

- Aksan, A., Erdal, I., Yalcin, S. S., Stein, J., & Samur, G. (2021). Osteopontin Levels in Human Milk Are Related to Maternal Nutrition and Infant Health and Growth. *Nutrients*, *13*(8). <https://doi.org/10.3390/NU13082670>
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S. Y., Ko, H. J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, *39*(9), 677–696. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2018.04.002>
- Anderson, R. C., MacGibbon, A. K. H., Haggarty, N., Armstrong, K. M., & Roy, N. C. (2018). Bovine dairy complex lipids improve in vitro measures of small intestinal epithelial barrier integrity. *PloS One*, *13*(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0190839>
- Angeloni, S., Ridet, J. L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S., Kochhar, S., Sigrist, H., & Sprenger, N. (2005). Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology*, *15*(1), 31–41. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWH143>
- Aniansson, G., Andersson, B., Lindstedt, R., & Svanborg, C. (1990). Anti-adhesive activity of human casein against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Microbial Pathogenesis*, *8*(5), 315–323. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(90\)90090-D](https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90090-D)
- Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J., & Kitaoka, M. (2011). Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(40), 34583–34592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248138>
- Ashkar, S., Weber, G. F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M. E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Glimcher, M. J., & Cantor, H. (2000). Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5454), 860–864. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5454.860>

- Atyeo, C., & Alter, G. (2021). The multifaceted roles of breast milk antibodies. *Cell*, *184*(6), 1486–1499. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.02.031>
- Azuma, N., Yamauchi, K., & Mitsuoka, T. (1984). Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human k-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, *48*(8), 2159–2162. <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866469>
- Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J., Desmyter, J., & De Clercq, E. (1988). Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(16), 6132–6136. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.16.6132>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, *60*(1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/J.PCL.2012.10.002>
- Baumgarth, N., Herman, O. C., Jager, G. C., Brown, L. E., Herzenberg, L. A., & Chen, J. (2000). B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(2), 271–280. <https://doi.org/10.1084/JEM.192.2.271>
- Bellodas Sanchez, J., & Kadrofske, M. (2019). Necrotizing enterocolitis. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *31*(3). <https://doi.org/10.1111/NMO.13569>
- Bencze, D., Fekete, T., & Pázmándi, K. (2021). Type I Interferon Production of Plasmacytoid Dendritic Cells under Control. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS22084190>
- Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., & Valenti, P. (2011). Antiviral properties of lactoferrin--a natural immunity molecule. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *16*(8), 6992–7012. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES16086992>

- Bhinder, G., Allaire, J. M., Garcia, C., Lau, J. T., Chan, J. M., Ryz, N. R., Bosman, E. S., Graef, F. A., Crowley, S. M., Celiberto, L. S., Berkmann, J. C., Dyer, R. A., Jacobson, K., Surette, M. G., Innis, S. M., & Vallance, B. A. (2017). Milk Fat Globule Membrane Supplementation in Formula Modulates the Neonatal Gut Microbiome and Normalizes Intestinal Development. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/SREP45274>
- Binsker, U., Lees, J. A., Hammond, A. J., & Weiser, J. N. (2020). Immune exclusion by naturally acquired secretory IgA against pneumococcal pilus-1. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(2), 927–941. <https://doi.org/10.1172/JCI132005>
- Boes, M., Prodeus, A. P., Schmidt, T., Carroll, M. C., & Chen, J. (1998). A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(12), 2381–2386. <https://doi.org/10.1084/JEM.188.12.2381>
- Bräck, W. M., Graverholt, G., & Gibson, G. R. (2002). Use of batch culture and a two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental alpha-lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(3), 231–237. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2002.TB00984.X>
- Brandtzaeg, P. (2010). The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *The Journal of Pediatrics*, 156(2 Suppl), S8. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDS.2009.11.014>
- Bridgman, S. L., Konya, T., Azad, M. B., Sears, M. R., Becker, A. B., Turvey, S. E., Mandhane, P. J., Subbarao, P., Allen, R., Anand, S. S., Befus, A. D., Brauer, M., Brook, J. R., Chen, E., Cyr, M., Daley, D., Dell, S., Denburg, J. A., Elliott, S., ... Field, C. J. (2016). Infant gut immunity: a preliminary study of IgA associations with breastfeeding. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 7(1), 68–72. <https://doi.org/10.1017/S2040174415007862>

- Brink, L. R., & Lönnerdal, B. (2020). Milk fat globule membrane: the role of its various components in infant health and development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 85. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2020.108465>
- Brück, W. M., Kelleher, S. L., Gibson, G. R., Nielsen, K. E., Chatterton, D. E. W., & Lönnerdal, B. (2003). rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic Escherichia coli. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 37(3), 273–280. <https://doi.org/10.1097/00005176-200309000-00014>
- Brunser Tesarschü, O., & Brunser Tesarschü, O. (2019a). Hidratos de carbono complejos en la leche materna: los oligosacáridos (Parte 1). *Revista Chilena de Nutrición*, 46(5), 626–632. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182019000500626>
- Brunser Tesarschü, O., & Brunser Tesarschü, O. (2019b). Leche Materna: Características funcionales de los oligosacáridos de la leche materna (Parte 2). *Revista Chilena de Nutrición*, 46(5), 633–643. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182019000500633>
- Bu, H. F., Zuo, X. L., Wang, X., Ensslin, M. A., Koti, V., Hsueh, W., Raymond, A. S., Shur, B. D., & Tan, X. Di. (2007). Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3673–3683. <https://doi.org/10.1172/JCI31841>
- Bunker, J. J., Erickson, S. A., Flynn, T. M., Henry, C., Koval, J. C., Meisel, M., Jabri, B., Antonopoulos, D. A., Wilson, P. C., & Bendelac, A. (2017). Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6361). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN6619>
- Burge, K. Y., Hannah, L., Eckert, J. V., Gunasekaran, A., & Chaaban, H. (2019). The Protective Influence of Chondroitin Sulfate, a Component of Human Milk, on Intestinal Bacterial Invasion and Translocation. *Journal of Human Lactation : Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 35(3), 538–549. <https://doi.org/10.1177/0890334419845338>

- Caplan, M. S., Russell, T., Xiao, Y., Amer, M., Kaup, S., & Jilling, T. (2001). Effect of polyunsaturated fatty acid (PUFA) supplementation on intestinal inflammation and necrotizing enterocolitis (NEC) in a neonatal rat model. *Pediatric Research*, *49*(5), 647–652. <https://doi.org/10.1203/00006450-200105000-00007>
- Carr, L. E., Virmani, M. D., Rosa, F., Munblit, D., Matazel, K. S., Elolimy, A. A., & Yeruva, L. (2021). Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.604080>
- Catanzaro, J. R., Strauss, J. D., Bielecka, A., Porto, A. F., Lobo, F. M., Urban, A., Schofield, W. B., & Palm, N. W. (2019). IgA-deficient humans exhibit gut microbiota dysbiosis despite secretion of compensatory IgM. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-49923-2>
- Cavaletto, M., Givonetti, A., & Cattaneo, C. (2022). The Immunological Role of Milk Fat Globule Membrane. *Nutrients*, *14*(21). <https://doi.org/10.3390/NU14214574>
- Chambers, C., Krogstad, P., Bertrand, K., Contreras, D., Tobin, N. H., Bode, L., & Aldrovandi, G. (2020). Evaluation for SARS-CoV-2 in Breast Milk From 18 Infected Women. *JAMA*, *324*(13), 1347–1348. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.15580>
- Chaput, C., Labigne, A., & Boneca, I. G. (2007). Characterization of Helicobacter pylori lytic transglycosylases Slt and MltD. *Journal of Bacteriology*, *189*(2), 422–429. <https://doi.org/10.1128/JB.01270-06>
- Chatterton, D. E. W., Nguyen, D. N., Bering, S. B., & Sangild, P. T. (2013). Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(8), 1730–1747. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2013.04.028>
- Chatterton, D. E. W., Rasmussen, J. T., Heegaard, C. W., Sørensen, E. S., & Petersen, T. E. (2004). In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(7–8), 373–383. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2003.12.004>

- Cheng, L., Akkerman, R., Kong, C., Walvoort, M. T. C., & de Vos, P. (2021). More than sugar in the milk: human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(7), 1184–1200. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754756>
- Cheng, L., Kiewiet, M. B. G., Groeneveld, A., Nauta, A., & de Vos, P. (2019). Human milk oligosaccharides and its acid hydrolysate LNT2 show immunomodulatory effects via TLRs in a dose and structure-dependent way. *Journal of Functional Foods*, *59*, 174–184. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.05.023>
- Chichlowski, M., De Lartigue, G., Bruce German, J., Raybould, H. E., & Mills, D. A. (2012). Human milk oligosaccharides increase mucin expression in experimental necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *55*(3), 321–327. <https://doi.org/10.1097/MPG.0B013E31824FB899>
- Chleilat, F., Klancic, T., Ma, K., Schick, A., Nettleton, J. E., & Reimer, R. A. (2020). Human Milk Oligosaccharide Supplementation Affects Intestinal Barrier Function and Microbial Composition in the Gastrointestinal Tract of Young Sprague Dawley Rats. *Nutrients*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/NU12051532>
- Chong, H. Y., Tan, L. T. H., Law, J. W. F., Hong, K. W., Ratnasingam, V., Ab Mutalib, N. S., Lee, L. H., & Letchumanan, V. (2022). Exploring the Potential of Human Milk and Formula Milk on Infants' Gut and Health. *Nutrients*, *14*(17). <https://doi.org/10.3390/NU14173554>
- Christensen, B., Karlsen, N. J., Jørgensen, S. D. S., Jacobsen, L. N., Ostenfeld, M. S., Petersen, S. V., Müllertz, A., & Sørensen, E. S. (2020). Milk osteopontin retains integrin-binding activity after in vitro gastrointestinal transit. *Journal of Dairy Science*, *103*(1), 42–51. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17212>
- Chu, H., Li, J., Yan, J., Bai, T., Schnabl, B., Zou, L., Yang, L., & Hou, X. (2020). Persistent SARS-CoV-2 RNA Positive in Feces but Negative in Breastmilk: A Case Report of COVID-19 in a Breastfeeding Patient. *Frontiers in Medicine*, *7*. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.562700>

- Chutipongtanate, S., Morrow, A. L., & Newburg, D. S. (2022). Human Milk Oligosaccharides: Potential Applications in COVID-19. *Biomedicines*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10020346>
- Civra, A., Leoni, V., Caccia, C., Sottemano, S., Tonetto, P., Coscia, A., Peila, C., Moro, G. E., Gaglioti, P., Bertino, E., Poli, G., & Lembo, D. (2019). Antiviral oxysterols are present in human milk at diverse stages of lactation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *193*. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2019.105424>
- Comstock, S. S., Wang, M., Hester, S. N., Li, M., & Donovan, S. M. (2014). Select human milk oligosaccharides directly modulate peripheral blood mononuclear cells isolated from 10-d-old pigs. *The British Journal of Nutrition*, *111*(5), 819–828. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003267>
- Correia, M., Michel, V., Matos, A. A., Carvalho, P., Oliveira, M. J., Ferreira, R. M., Dillies, M. A., Huerre, M., Seruca, R., Figueiredo, C., Machado, J. C., & Touati, E. (2012). Docosahexaenoic acid inhibits *Helicobacter pylori* growth in vitro and mice gastric mucosa colonization. *PloS One*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035072>
- Coursodon, C. F., & Dvorak, B. (2012). Epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis. *Current Opinion in Pediatrics*, *24*(2). <https://doi.org/10.1097/MOP.0B013E3283504DDB>
- Damaceno, Q. S., Souza, J. P., Nicoli, J. R., Paula, R. L., Assis, G. B., Figueiredo, H. C., Azevedo, V., & Martins, F. S. (2017). Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *9*(4), 371–379. <https://doi.org/10.1007/S12602-017-9270-1>
- Dawod, B., & Marshall, J. S. (2019). Cytokines and Soluble Receptors in Breast Milk as Enhancers of Oral Tolerance Development. *Frontiers in Immunology*, *10*(JAN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00016>

- de Sá Almeida, J. S., de Oliveira Marre, A. T., Teixeira, F. L., Boente, R. F., Domingues, R. M. C. P., de Paula, G. R., & Lobo, L. A. (2020). Lactoferrin and lactoferricin B reduce adhesion and biofilm formation in the intestinal symbionts *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Anaerobe*, 64. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2020.102232>
- Demmelair, H., Prell, C., Timby, N., & Lönnerdal, B. (2017). Benefits of Lactoferrin, Osteopontin and Milk Fat Globule Membranes for Infants. *Nutrients*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/NU9080817>
- Dong, Y., Chi, X., Hai, H., Sun, L., Zhang, M., Xie, W. F., & Chen, W. (2020). Antibodies in the breast milk of a maternal woman with COVID-19. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1467–1469. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780952>
- Donovan, S. M., Monaco, M. H., Drnevich, J., Kvistgaard, A. S., Hernell, O., & Lönnerdal, B. (2014). Bovine osteopontin modifies the intestinal transcriptome of formula-fed infant rhesus monkeys to be more similar to those that were breastfed. *The Journal of Nutrition*, 144(12), 1910–1919. <https://doi.org/10.3945/JN.114.197558>
- Duncombe, C. J., McCulloch, D. J., Shuey, K. D., Logue, J. K., Franko, N. M., Wolf, C. R., Frivold, C. J., & Chu, H. Y. (2021). Dynamics of breast milk antibody titer in the six months following SARS-CoV-2 infection. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 142. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2021.104916>
- Durand, D., Ochoa, T. J., Bellomo, S. M. E., Contreras, C. A., Bustamante, V. H., Ruiz, J., & Cleary, T. G. (2013). Detection of secretory immunoglobulin A in human colostrum as mucosal immune response against proteins of the type III secretion system of *Salmonella*, *Shigella* and enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(10), 1122–1126. <https://doi.org/10.1097/INF.0B013E318293306C>
- Duska-McEwen, G., Senft, A. P., Ruetschilling, T. L., Barrett, E. G., Buck, R. H., Duska-McEwen, G., Senft, A. P., Ruetschilling, T. L., Barrett, E. G., & Buck, R. H. (2014). Human Milk Oligosaccharides Enhance Innate Immunity to Respiratory Syncytial

- Virus and Influenza in Vitro. *Food and Nutrition Sciences*, 5(14), 1387–1398.  
<https://doi.org/10.4236/FNS.2014.514151>
- Einerhand, A. W. C., van Loo-Bouwman, C. A., Weiss, G. A., Wang, C., Ba, G., Fan, Q., He, B., & Smit, G. (2022). Can Lactoferrin, a Natural Mammalian Milk Protein, Assist in the Battle against COVID-19? *Nutrients*, 14(24).  
<https://doi.org/10.3390/NU14245274>
- Elass, E., Masson, M., Mazurier, J., & Legrand, D. (2002). Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8 in human endothelial cells. *Infection and Immunity*, 70(4), 1860–1866.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1860-1866.2002>
- Ellison, R. T., & Giehl, T. J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(4), 1080–1091.  
<https://doi.org/10.1172/JCI115407>
- Embleton, N. D., Berrington, J. E., Dorling, J., Ewer, A. K., Juszczak, E., Kirby, J. A., Lamb, C. A., Lanyon, C. V., McGuire, W., Probert, C. S., Rushton, S. P., Shirley, M. D., Stewart, C. J., & Cummings, S. P. (2017). Mechanisms Affecting the Gut of Preterm Infants in Enteral Feeding Trials. *Frontiers in Nutrition*, 4.  
<https://doi.org/10.3389/FNUT.2017.00014>
- Fadlallah, J., El Kafsi, H., Sterlin, D., Juste, C., Parizot, C., Dorgham, K., Autaa, G., Gouas, D., Almeida, M., Lepage, P., Pons, N., Le Chatelier, E., Levenez, F., Kennedy, S., Galleron, N., De Barros, J. P. P., Malphettes, M., Galicier, L., Boutboul, D., ... Gorochov, G. (2018). Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. *Science Translational Medicine*, 10(439).  
<https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAN1217>
- Fan, C., Lei, D., Fang, C., Li, C., Wang, M., Liu, Y., Bao, Y., Sun, Y., Huang, J., Guo, Y., Yu, Y., & Wang, S. (2021). Perinatal Transmission of 2019 Coronavirus Disease-Associated Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Should We Worry?

*Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 72(5), 862–864. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA226>

Fell, J. M. E., Paintin, M., Arnaud-Battandieri, F., Beattie, R. M., Hollis, A., Kitching, P., Donnet-Hughes, A., MacDonald, T. T., & Walker-Smith, J. A. (2000). Mucosal healing and a fall in mucosal pro-inflammatory cytokine mRNA induced by a specific oral polymeric diet in paediatric Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 14(3), 281–289. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2036.2000.00707.X>

Figuerola-Lozano, S., & de Vos, P. (2019). Relationship Between Oligosaccharides and Glycoconjugates Content in Human Milk and the Development of the Gut Barrier. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 121–139. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12400>

Fitzstevens, J. L., Smith, K. C., Hagadorn, J. I., Caimano, M. J., Matson, A. P., & Brownell, E. A. (2017). Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutrition in Clinical Practice : Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 32(3), 354–364. <https://doi.org/10.1177/0884533616670150>

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543–549. <https://doi.org/10.1038/NATURE09646>

Gabriel, M. Á. M., Martínez, A. M. M., Martínez, M. E. M., & Pedroche, J. A. (2020). Negative Transmission of SARS-CoV-2 to Hand-Expressed Colostrum from SARS-CoV-2-Positive Mothers. *Breastfeeding Medicine : The Official Journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, 15(8), 492–494. <https://doi.org/10.1089/BFM.2020.0183>

Gálvez-Iriqui, A. C., Plascencia-Jatomea, M., & Bautista-Baños, S. (2020). Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-6>

- Gao, X., Wang, S., Zeng, W., Chen, S., Wu, J., Lin, X., Liu, Y., Sun, Z., & Feng, L. (2020). Clinical and immunologic features among COVID-19-affected mother-infant pairs: antibodies to SARS-CoV-2 detected in breast milk. *New Microbes and New Infections*, 37. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2020.100752>
- Gila-Diaz, A., Arribas, S. M., Algara, A., Martín-Cabrejas, M. A., Pablo, Á. L. L. de, Pipaón, M. S. de, & Ramiro-Cortijo, D. (2019). A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. *Nutrients*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/NU11061307>
- Glass, R. I., Svennerholm, A.-M., Stoll, B. J., Khan, M. R., Hossain, K. M. B., Hug, M. I., & Holmgren, J. (1983). Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast milk. *The New England Journal of Medicine*, 308(23), 1389–1392. <https://doi.org/10.1056/NEJM198306093082304>
- Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S., & Collado, M. C. (2016). The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 21(6), 400–405. <https://doi.org/10.1016/J.SINY.2016.05.003>
- Gong, J., Dong, H., Xia, Q. S., Huang, Z. yi, Wang, D. kun, Zhao, Y., Liu, W. hua, Tu, S. hao, Zhang, M. min, Wang, Q., & Lu, F. er. (2020). Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: a retrospective study. *BMC Infectious Diseases*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-020-05681-5>
- Gopalakrishna, K. P., Macadangdang, B. R., Rogers, M. B., Tometich, J. T., Firek, B. A., Baker, R., Ji, J., Burr, A. H. P., Ma, C., Good, M., Morowitz, M. J., & Hand, T. W. (2019). Maternal IgA protects against the development of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Nature Medicine*, 25(7), 1110–1115. <https://doi.org/10.1038/S41591-019-0480-9>
- Gotoh, A., Katoh, T., Sakanaka, M., Ling, Y., Yamada, C., Asakuma, S., Urashima, T., Tomabechi, Y., Katayama-Ikegami, A., Kurihara, S., Yamamoto, K., Harata, G., He, F., Hirose, J., Kitaoka, M., Okuda, S., & Katayama, T. (2018). Sharing of human milk

- oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32080-3>
- Gray, K. J., Bordt, E. A., Atyeo, C., Deriso, E., Akinwunmi, B., Young, N., Baez, A. M., Shook, L. L., Cvrk, D., James, K., De Guzman, R. M., Brigida, S., Diouf, K., Goldfarb, I., Bebell, L. M., Yonker, L. M., Fasano, A., Rabi, S. A., Elovitz, M. A., ... Edlow, A. G. (2021). COVID-19 vaccine response in pregnant and lactating women: a cohort study. *MedRxiv: The Preprint Server for Health Sciences*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.07.21253094>
- Groß, R., Conzelmann, C., Müller, J. A., Stenger, S., Steinhart, K., Kirchhoff, F., & Münch, J. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in human breastmilk. *Lancet (London, England)*, 395(10239), 1757–1758. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31181-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31181-8)
- Gu, S., Chen, Y., Wu, Z., Chen, Y., Gao, H., Lv, L., Guo, F., Zhang, X., Luo, R., Huang, C., Lu, H., Zheng, B., Zhang, J., Yan, R., Zhang, H., Jiang, H., Xu, Q., Guo, J., Gong, Y., ... Li, L. (2020). Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(10), 2669–2678. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA709>
- Gülden, E., Wong, F. S., & Wen, L. (2015). The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 159(2), 143–153. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2015.05.013>
- Guo, S., Gillingham, T., Guo, Y., Meng, D., Zhu, W., Allen Walker, W., & Ganguli, K. (2017). Secretions of *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus* Protect Intestinal Epithelial Barrier Function. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(3), 404–412. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001310>
- Hafez, M. M., Aboulwafa, M. M., Yassien, M. A., & Hassouna, N. A. (2008). Role of different classes of mammalian cell surface molecules in adherence of coagulase

- positive and coagulase negative staphylococci. *Journal of Basic Microbiology*, 48(5), 353–362. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700402>
- Halpern, M. D., Holubec, H., Dominguez, J. A., Williams, C. S., Meza, Y. G., McWilliam, D. L., Payne, C. M., McCuskey, R. S., Besselsen, D. G., & Dvorak, B. (2002). Up-regulation of IL-18 and IL-12 in the ileum of neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *Pediatric Research*, 51(6), 733–739. <https://doi.org/10.1203/00006450-200206000-00012>
- Hamosh, M. (2001). Bioactive factors in human milk. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 69–86. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70286-8](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70286-8)
- Harmsen, H. J. M., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., & Welling, G. W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30(1), 61–67. <https://doi.org/10.1097/00005176-200001000-00019>
- Hashizume, T., Togawa, A., Nochi, T., Igarashi, O., Kweon, M. N., Kiyono, H., & Yamamoto, M. (2008). Peyer's patches are required for intestinal immunoglobulin A responses to *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, 76(3), 927–934. <https://doi.org/10.1128/IAI.01145-07>
- Hawkes, J. S., Bryan, D. L., James, M. J., & Gibson, R. A. (1999). Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. *Pediatric Research*, 46(2), 194–199. <https://doi.org/10.1203/00006450-199908000-00012>
- He, Y., Liu, S., Leone, S., & Newburg, D. S. (2014). Human colostrum oligosaccharides modulate major immunologic pathways of immature human intestine. *Mucosal Immunology*, 7(6), 1326–1339. <https://doi.org/10.1038/MI.2014.20>
- He, Y. Y., Liu, S. B., Kling, D. E., Leone, S., Lawlor, N. T., Huang, Y., Feinberg, S. B., Hill, D. R., & Newburg, D. S. (2016). The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose

- modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. *Gut*, 65(1), 33–46. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2014-307544>
- Hendricks, G. M., & Guo, M. R. (2021). Bioactive components in human milk. In *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology* (pp. 61–80). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102898-8.00003-9>
- Henrick, B. M., Nag, K., Yao, X. D., Drannik, A. G., Aldrovandi, G. M., & Rosenthal, K. L. (2012). Milk matters: soluble Toll-like receptor 2 (sTLR2) in breast milk significantly inhibits HIV-1 infection and inflammation. *PloS One*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040138>
- Henrick, B. M., Yao, X. D., Nasser, L., Roozrogousheh, A., & Rosenthal, K. L. (2017). Breastfeeding Behaviors and the Innate Immune System of Human Milk: Working Together to Protect Infants against Inflammation, HIV-1, and Other Infections. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01631>
- Henry-Stanley, M. J., Hess, D. J., Erickson, E. A., Garni, R. M., & Wells, C. L. (2003). Role of heparan sulfate in interactions of *Listeria monocytogenes* with enterocytes. *Medical Microbiology and Immunology*, 192(2), 107–115. <https://doi.org/10.1007/S00430-002-0165-7>
- Henry-Stanley, M. J., Hess, D. J., Erlandsen, S. L., & Wells, C. L. (2005). Ability of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 to participate in bacterial translocation across the intestinal epithelial barrier. *Shock (Augusta, Ga.)*, 24(6), 571–576. <https://doi.org/10.1097/01.SHK.0000184286.95493.78>
- Hernell, O., Timby, N., Domellöf, M., & Lönnerdal, B. (2016). Clinical Benefits of Milk Fat Globule Membranes for Infants and Children. *The Journal of Pediatrics*, 173 Suppl, S60–S65. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDS.2016.02.077>
- Hess, D. J., Henry-Stanley, M. J., & Wells, C. L. (2014). Antibacterial synergy of glycerol monolaurate and aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11), 6970–6973. <https://doi.org/10.1128/AAC.03672-14>

- HF, G., & S, V. (2016). Nutrients and neurodevelopment: lipids. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 114(5). <https://doi.org/10.5546/AAP.2016.ENG.472>
- Hill, D. R., & Newburg, D. S. (2015). Clinical applications of bioactive milk components. *Nutrition Reviews*, 73(7), 463–476. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUV009>
- Hill, D. R., Rho, H. K., Kessler, S. P., Amin, R., Homer, C. R., McDonald, C., Cowman, M. K., & De La Motte, C. A. (2013). Human milk hyaluronan enhances innate defense of the intestinal epithelium. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(40), 29090–29104. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.468629>
- Hooper, L. V, Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (n.d.). *The Gut Microbiota REVIEW Interactions Between the Microbiota and the Immune System*. <http://science.sciencemag.org/>
- Hrdý, J., Novotná, O., Kocourková, I., & Prokešová, L. (2012). Cytokine expression in the colostrum cells of healthy and allergic mothers. *Folia Microbiologica*, 57(3), 215–219. <https://doi.org/10.1007/S12223-012-0112-Y>
- Hu, Y., Meng, X., Zhang, F., Xiang, Y., & Wang, J. (2021). The in vitro antiviral activity of lactoferrin against common human coronaviruses and SARS-CoV-2 is mediated by targeting the heparan sulfate co-receptor. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 317–330. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1888660>
- Huang, C. B., & Ebersole, J. L. (2010). A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *Molecular Oral Microbiology*, 25(1), 75–80. <https://doi.org/10.1111/J.2041-1014.2009.00553.X>
- Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 42, 11–55. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2015.02.003>
- Jana, M., Ghosh, A., Santra, A., Kar, R. K., Misra, A. K., & Bhunia, A. (2017). Synthesis of novel muramic acid derivatives and their interaction with lysozyme: Action of lysozyme

revisited. *Journal of Colloid and Interface Science*, 498, 395–404.  
<https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.03.060>

Jantscher-Krenn, E., Lauwaet, T., Bliss, L. A., Reed, S. L., Gillin, F. D., & Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity in vitro. *The British Journal of Nutrition*, 108(10), 1839–1846.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114511007392>

Järvinen, K. M., Westfall, J. E., Seppo, M. S., James, A. K., Tsuang, A. J., Feustel, P. J., Sampson, H. A., & Berin, C. (2014). Role of maternal elimination diets and human milk IgA in the development of cow's milk allergy in the infants. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 44(1), 69–78. <https://doi.org/10.1111/CEA.12228>

Jaziri, M., Migliore-Samour, D., Casabianca-Pignède, M. R., Keddad, K., Morgat, J. L., & Jollès, P. (1992). Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1160(3), 251–261.  
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90085-R](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90085-R)

Jiang, J. H., Hassan, K. A., Begg, S. L., Rupasinghe, T. W. T., Naidu, V., Pederick, V. G., Khorvash, M., Whittall, J. J., Paton, J. C., Paulsen, I. T., McDevitt, C. A., Peleg, A. Y., & Eijkelkamp, B. A. (2019). Identification of Novel *Acinetobacter baumannii* Host Fatty Acid Stress Adaptation Strategies. *MBio*, 10(1), 1–6.  
<https://doi.org/10.1128/MBIO.02056-18>

Jiang, R., & Lönnerdal, B. (2016). Biological roles of milk osteopontin. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 19(3), 214–219.  
<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000275>

Jiang, R., & Lönnerdal, B. (2019). Osteopontin in human milk and infant formula affects infant plasma osteopontin concentrations. *Pediatric Research*, 85(4), 502–505.  
<https://doi.org/10.1038/S41390-018-0271-X>

- Johansen, F. E., & Brandtzaeg, P. (2004). Transcriptional regulation of the mucosal IgA system. *Trends in Immunology*, 25(3), 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.01.001>
- Johnson, C. C., & Ownby, D. R. (2017). The infant gut bacterial microbiota and risk of pediatric asthma and allergic diseases. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 179, 60–70. <https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2016.06.010>
- Kai, K., Komine, K. I., Komine, Y., Kuroishi, T., Kozutsumi, T., Kobayashi, J., Ohta, M., Kitamura, H., & Kumagai, K. (2002). Lactoferrin stimulates A Staphylococcus aureus killing activity of bovine phagocytes in the mammary gland. *Microbiology and Immunology*, 46(3), 187–194. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2002.TB02685.X>
- Kaplan, M., Şahutoğlu, A. S., Sarıtaş, S., Duman, H., Arslan, A., Pekdemir, B., & Karav, S. (2022). Role of milk glycome in prevention, treatment, and recovery of COVID-19. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.1033779>
- Karatepe, H. O., Kilincaslan, H., Berber, M., Ozen, A., Saricoban, H. E., Ustek, D., Kemik, A. S., Adas, M., & Bakar, F. (2014). The effect of vascular endothelial growth factor overexpression in experimental necrotizing enterocolitis. *Pediatric Surgery International*, 30(3), 327–332. <https://doi.org/10.1007/S00383-013-3460-Z>
- Kaushik, D., Bhandari, R., & Kuhad, A. (2021). TLR4 as a therapeutic target for respiratory and neurological complications of SARS-CoV-2. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 25(6), 491–508. <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1918103>
- Kazimbaya, K. M., Chisenga, C. C., Simuyandi, M., Phiri, C. M., Laban, N. M., Bosomprah, S., Permar, S. R., Munsaka, S., & Chilengi, R. (2020). In-vitro inhibitory effect of maternal breastmilk components on rotavirus vaccine replication and association with infant seroconversion to live oral rotavirus vaccine. *PloS One*, 15(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0240714>

- Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics*, 63(8), 301–309. <https://doi.org/10.3345/CEP.2020.00059>
- Knoop, K. A., & Newberry, R. D. (2018). Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal Immunology*, 11(6), 1551–1557. <https://doi.org/10.1038/S41385-018-0039-Y>
- Koch, M. A., Reiner, G. L., Lugo, K. A., Kreuk, L. S. M., Stanbery, A. G., Ansaldo, E., Seher, T. D., Ludington, W. B., & Barton, G. M. (2016). Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell*, 165(4), 827–841. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.04.055>
- Koletzko, B. (2016). Human Milk Lipids. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 69 Suppl 2(2), 28–40. <https://doi.org/10.1159/000452819>
- Kong, C., Elderman, M., Cheng, L., de Haan, B. J., Nauta, A., & de Vos, P. (2019). Modulation of Intestinal Epithelial Glycocalyx Development by Human Milk Oligosaccharides and Non-Digestible Carbohydrates. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(17). <https://doi.org/10.1002/MNFR.201900303>
- Kotani, Y., Kunisawa, J., Suzuki, Y., Sato, I., Saito, T., Toba, M., Kohda, N., & Kiyono, H. (2014). Role of *Lactobacillus pentosus* Strain b240 and the Toll-like receptor 2 axis in Peyer's patch dendritic cell-mediated immunoglobulin A enhancement. *PloS One*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0091857>
- Kuntz, S., Rudloff, S., & Kunz, C. (2008). Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *The British Journal of Nutrition*, 99(3), 462–471. <https://doi.org/10.1017/S0007114507824068>
- Kvistgaard, A. S., Pallesen, L. T., Arias, C. F., López, S., Petersen, T. E., Heegaard, C. W., & Rasmussen, J. T. (2004). Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on

- rotavirus infections. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4088–4096.  
[https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(04\)73551-1](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(04)73551-1)
- Lai, X., Yu, Y., Xian, W., Ye, F., Ju, X., Luo, Y., Dong, H., Zhou, Y. H., Tan, W., Zhuang, H., Li, T., Liu, X., Ding, Q., & Xiang, K. (2022). Identified human breast milk compositions effectively inhibit SARS-CoV-2 and variants infection and replication. *IScience*, 25(4). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2022.104136>
- Lallès, J. P. (2016). Dairy products and the French paradox: Could alkaline phosphatases play a role? *Medical Hypotheses*, 92, 7–11.  
<https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2016.04.033>
- Lamberti, L. M., Fischer Walker, C. L., Noiman, A., Victora, C., & Black, R. E. (2011). Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. *BMC Public Health*, 11 Suppl 3(Suppl 3). <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-S3-S15>
- Lang, J., Yang, N., Deng, J., Liu, K., Yang, P., Zhang, G., & Jiang, C. (2011). Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. *PloS One*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023710>
- Lawrence, R. M. (2022). Host-Resistance Factors and Immunologic Significance of Human Milk. *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*, 145–192.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-68013-4.00005-5>
- Layman, D. K., Lönnnerdal, B., & Fernstrom, J. D. (2018). Applications for  $\alpha$ -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews*, 76(6), 444–460.  
<https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUY004>
- Le Hurou-Luron, I., Blat, S., & Boudry, G. (2010). Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 23–36. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000065>
- Lee, H., Padhi, E., Hasegawa, Y., Larke, J., Parenti, M., Wang, A., Hernell, O., Lönnnerdal, B., & Slupsky, C. (2018). Compositional Dynamics of the Milk Fat Globule and Its Role

in Infant Development. *Frontiers in Pediatrics*, 6.  
<https://doi.org/10.3389/FPED.2018.00313>

Legrand, D. (2016). Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. *The Journal of Pediatrics*, 173 Suppl, S10–S15. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDI.2016.02.071>

Lembo, D., Cagno, V., Civra, A., & Poli, G. (2016). Oxysterols: An emerging class of broad spectrum antiviral effectors. *Molecular Aspects of Medicine*, 49, 23–30. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2016.04.003>

Lepage, P., & Van De Perre, P. (2012). The immune system of breast milk: antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 743, 121–137. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2251-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2251-8_9)

Lewis, E. D., Richard, C., Larsen, B. M., & Field, C. J. (2017). The Importance of Human Milk for Immunity in Preterm Infants. *Clinics in Perinatology*, 44(1), 23–47. <https://doi.org/10.1016/J.CLP.2016.11.008>

Liao, Y., Alvarado, R., Phinney, B., & Lönnerdal, B. (2011). Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period. *Journal of Proteome Research*, 10(8), 3530–3541. <https://doi.org/10.1021/PR200149T>

Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., & O'Neill, L. A. J. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Reviews. Immunology*, 5(6), 446–458. <https://doi.org/10.1038/NRI1630>

Lin, A. E., Autran, C. A., Espanola, S. D., Bode, L., & Nizet, V. (2014). Human milk oligosaccharides protect bladder epithelial cells against uropathogenic *Escherichia coli* invasion and cytotoxicity. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(3), 389–398. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIT464>

Lin, A. E., Autran, C. A., Szyszka, A., Escajadillo, T., Huang, M., Godula, K., Prudden, A. R., Boons, G. J., Lewis, A. L., Doran, K. S., Nizet, V., & Bode, L. (2017). Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B *Streptococcus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(27), 11243–11249. <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.789974>

- Liu, B., Yu, Z., Chen, C., Kling, D. E., & Newburg, D. S. (2012). Human milk mucin 1 and mucin 4 inhibit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion of human intestinal epithelial cells in vitro. *The Journal of Nutrition*, *142*(8), 1504–1509. <https://doi.org/10.3945/JN.111.155614>
- Liu, L., Jiang, R., & Lönnerdal, B. (2019). Assessment of bioactivities of the human milk lactoferrin-osteopontin complex in vitro. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *69*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2019.03.016>
- Liu, N., Feng, G., Zhang, X., Hu, Q., Sun, S., Sun, J., Sun, Y., Wang, R., Zhang, Y., Wang, P., & Li, Y. (2021). The Functional Role of Lactoferrin in Intestine Mucosal Immune System and Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Nutrition*, *8*. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.759507>
- Liu, N., Zhang, T., Ma, L., Zhang, H., Wang, H., Wei, W., Pei, H., & Li, H. (2021). The impact of ABO blood group on COVID-19 infection risk and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Blood Reviews*, *48*. <https://doi.org/10.1016/J.BLRE.2020.100785>
- Liu, W., Wang, J., Li, W., Zhou, Z., Liu, S., & Rong, Z. (2020). Clinical characteristics of 19 neonates born to mothers with COVID-19. *Frontiers of Medicine*, *14*(2), 193–198. <https://doi.org/10.1007/S11684-020-0772-Y>
- Lokossou, G. A. G., Kouakanou, L., Schumacher, A., & Zenclussen, A. C. (2022). Human Breast Milk: From Food to Active Immune Response With Disease Protection in Infants and Mothers. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.849012>
- Lönnerdal, B. (2014). Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *99*(3). <https://doi.org/10.3945/AJCN.113.071993>

- Lönnerdal, B. (2016). Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. *Journal of Pediatrics*, 173, S4–S9. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.070>
- Lönnerdal, B. (2017). Bioactive Proteins in Human Milk-Potential Benefits for Preterm Infants. *Clinics in Perinatology*, 44(1), 179–191. <https://doi.org/10.1016/J.CLP.2016.11.013>
- Lönnerdal, B., Kvistgaard, A. S., Peerson, J. M., Donovan, S. M., & Peng, Y. M. (2016). Growth, Nutrition, and Cytokine Response of Breast-fed Infants and Infants Fed Formula With Added Bovine Osteopontin. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(4), 650–657. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001005>
- Lu, J., Jilling, T., Li, D., & Caplan, M. S. (2007). Polyunsaturated fatty acid supplementation alters proinflammatory gene expression and reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatric Research*, 61(4), 427–432. <https://doi.org/10.1203/PDR.0B013E3180332CA5>
- M, S., P, F., S, B., L, H., B, L., S, N., & O, H. (1995). Human milk kappa-casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 21(3), 288–296. <https://doi.org/10.1097/00005176-199510000-00006>
- Maheshwari, A., Lu, W., Lacson, A., Barleycorn, A. A., Nolan, S., Christensen, R. D., & Calhoun, D. A. (2002). Effects of interleukin-8 on the developing human intestine. *Cytokine*, 20(6), 256–267. <https://doi.org/10.1006/cyto.2002.1996>
- Maheshwari, A., Schelonka, R. L., Dimmitt, R. A., Carlo, W. A., Munoz-Hernandez, B., Das, A., McDonald, S. A., Thorsen, P., Skogstrand, K., Hougaard, D. M., & Higgins, R. D. (2014). Cytokines associated with necrotizing enterocolitis in extremely-low-birth-weight infants. *Pediatric Research*, 76(1), 100–108. <https://doi.org/10.1038/PR.2014.48>

- Malago, J. J., Tooten, P. C. J., & Koninkx, J. F. J. G. (2010). Anti-inflammatory properties of probiotic bacteria on Salmonella-induced IL-8 synthesis in enterocyte-like Caco-2 cells. *Beneficial Microbes*, *1*(2), 121–130. <https://doi.org/10.3920/BM2009.0021>
- Martinez, J. G., Waldon, M., Huang, Q., Alvarez, S., Oren, A., Sandoval, N., Du, M., Zhou, F., Zenz, A., Lohners, K., Desharnais, R., & Porter, E. (2009). Membrane-targeted synergistic activity of docosahexaenoic acid and lysozyme against *Pseudomonas aeruginosa*. *The Biochemical Journal*, *419*(1), 193–200. <https://doi.org/10.1042/BJ20081505>
- Maruyama, K., Hida, M., Kohgo, T., & Fukunaga, Y. (2009). Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens. *Pediatrics International : Official Journal of the Japan Pediatric Society*, *51*(3), 342–345. <https://doi.org/10.1111/J.1442-200X.2008.02748.X>
- Mastromarino, P., Capobianco, D., Campagna, G., Laforgia, N., Drimaco, P., Dileone, A., & Baldassarre, M. E. (2014). Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *27*(5), 1077–1086. <https://doi.org/10.1007/S10534-014-9762-3>
- Mathias, A., & Corthésy, B. (2011). N-Glycans on secretory component: mediators of the interaction between secretory IgA and gram-positive commensals sustaining intestinal homeostasis. *Gut Microbes*, *2*(5), 287–293. <https://doi.org/10.4161/GMIC.2.5.18269>
- Mehta, R., & Petrova, A. (2014). Is variation in total antioxidant capacity of human milk associated with levels of bio-active proteins? *Journal of Perinatology : Official Journal of the California Perinatal Association*, *34*(3), 220–222. <https://doi.org/10.1038/JP.2013.151>
- Melendi, G. A., Coviello, S., Bhat, N., Zea-Hernandez, J., Ferolla, F. M., & Polack, F. P. (2010). Breastfeeding is associated with the production of type I interferon in infants infected with influenza virus. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, *99*(10), 1517–1521. <https://doi.org/10.1111/J.1651-2227.2010.01862.X>

- Migliore-Samour, D., Roch-Arveiller, M., Tissot, M., Jazziri, M., Keddad, K., Giroud, J. P., & Jollés, P. (1992). Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. *Biochemical Pharmacology*, *44*(4), 673–680. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90402-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90402-5)
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *81*(4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>
- Mirabelli, C., Wotring, J. W., Zhang, C. J., McCarty, S. M., Fursmidt, R., Pretto, C. D., Qiao, Y., Zhang, Y., Frum, T., Kadambi, N. S., Amin, A. T., O'Meara, T. R., Spence, J. R., Huang, J., Alysandratos, K. D., Kotton, D. N., Handelman, S. K., Wobus, C. E., Weatherwax, K. J., ... Sexton, J. Z. (2021). Morphological cell profiling of SARS-CoV-2 infection identifies drug repurposing candidates for COVID-19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(36). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2105815118/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Mohamed, H. J. J., Lee, E. K. H., Woo, K. C. K., Sarvananthan, R., Lee, Y. Y., & Mohd Hussin, Z. A. (2022). Brain-immune-gut benefits with early life supplementation of milk fat globule membrane. *JGH Open : An Open Access Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *6*(7), 454–461. <https://doi.org/10.1002/JGH3.12775>
- Morrin, S. T., Buck, R. H., Farrow, M., & Hickey, R. M. (2021). Milk-derived anti-infectives and their potential to combat bacterial and viral infection. *Journal of Functional Foods*, *81*, 104442. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2021.104442>
- Mousavi, S., Moradi, M., Khorshidahmad, T., & Motamedi, M. (2015). Anti-Inflammatory Effects of Heparin and Its Derivatives: A Systematic Review. *Advances in Pharmacological Sciences*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/507151>

- Mshvildadze, M., Neu, J., Shuster, J., Theriaque, D., Li, N., & Mai, V. (2010). Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *The Journal of Pediatrics*, *156*(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDI.2009.06.063>
- Munblit, D., Peroni, D. G., Boix-Amorós, A., Hsu, P. S., Van't Land, B., Gay, M. C. L., Kolotilina, A., Skevaki, C., Boyle, R. J., Collado, M. C., Garssen, J., Geddes, D. T., Nanan, R., Slupsky, C., Wegienka, G., Kozyrskyj, A. L., & Warner, J. O. (2017). Human Milk and Allergic Diseases: An Unsolved Puzzle. *Nutrients*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/NU9080894>
- Nathavitharana, K. A., Catty, D., & McNeish, A. S. (1994). IgA antibodies in human milk: epidemiological markers of previous infections? *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, *71*(3). <https://doi.org/10.1136/FN.71.3.F192>
- Neu, J., & Walker, W. A. (2011). Necrotizing enterocolitis. *The New England Journal of Medicine*, *364*(3), 255–264. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1005408>
- Newburg, D. S., Linhardt, R. J., Ampofo, S. A., & Yolken, R. H. (1995). Human milk glycosaminoglycans inhibit HIV glycoprotein gp120 binding to its host cell CD4 receptor. *The Journal of Nutrition*, *125*(3), 419–424. <https://doi.org/10.1093/JN/125.3.419>
- Ochoa, T. J., Brown, E. L., Guion, C. E., Chen, J. Z., McMahon, R. J., & Cleary, T. G. (2006). Effect of lactoferrin on enteroaggregative E. coli (EAEC). *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *84*(3), 369–376. <https://doi.org/10.1139/O06-053>
- Ossa, J. C., Yáñez, D., Valenzuela, R., Gallardo, P., Lucero, Y., & Farfán, M. J. (2018). Intestinal Inflammation in Chilean Infants Fed With Bovine Formula vs. Breast Milk and Its Association With Their Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(JUN). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00190>
- Ozgurtas, T., Aydin, I., Turan, O., Koc, E., Hirfanoglu, I. M., Acikel, C. H., Akyol, M., & Erbil, M. K. (2010). Vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor,

insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor levels in human milk of mothers with term and preterm neonates. *Cytokine*, 50(2), 192–194. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2010.02.008>

Pace, R. M., Williams, J. E., Järvinen, K. M., Belfort, M. B., Pace, C. D. W., Lackey, K. A., Gogel, A. C., Nguyen-Contant, P., Kanagaiah, P., Fitzgerald, T., Ferri, R., Young, B., Rosen-Carole, C., Diaz, N., Meehan, C. L., Caffé, B., Sangster, M. Y., Topham, D., McGuire, M. A., ... McGuire, M. K. (2021). Characterization of SARS-CoV-2 RNA, Antibodies, and Neutralizing Capacity in Milk Produced by Women with COVID-19. *MBio*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/MBIO.03192-20>

Palmeira, P., & Carneiro-Sampaio, M. (2016). Immunology of breast milk. *Revista Da Associacao Medica Brasileira (1992)*, 62(6), 584–593. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.62.06.584>

Pannaraj, P. S., Li, F., Cerini, C., Bender, J. M., Yang, S., Rollie, A., Adisetiyo, H., Zabih, S., Lincez, P. J., Bittinger, K., Bailey, A., Bushman, F. D., Sleasman, J. W., & Aldrovandi, G. M. (2017). Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatrics*, 171(7), 647–654. <https://doi.org/10.1001/JAMAPEDIATRICS.2017.0378>

Patel, M., Glass, R. I., Jiang, B., Santosham, M., Lopman, B., & Parashar, U. (2013). A systematic review of anti-rotavirus serum IgA antibody titer as a potential correlate of rotavirus vaccine efficacy. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(2), 284–294. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIT166>

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., & Von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426(3), 439–448. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00165-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00165-2)

Pérez-bermejo, M., Peris-ochando, B., & Murillo-llorente, M. T. (2021). COVID-19: Relationship and Impact on Breastfeeding-A Systematic Review. *Nutrients*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/NU13092972>

- Perl, S. H., Uzan-Yulzari, A., Klainer, H., Asiskovich, L., Youngster, M., Rinott, E., & Youngster, I. (2021). SARS-CoV-2-Specific Antibodies in Breast Milk After COVID-19 Vaccination of Breastfeeding Women. *JAMA*, 325(19), 2013–2014. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.5782>
- Peroni, D. G., Pescollderungg, L., Piacentini, G. L., Rigotti, E., Maselli, M., Watschinger, K., Piazza, M., Pigozzi, R., & Boner, A. L. (2010). Immune regulatory cytokines in the milk of lactating women from farming and urban environments. *Pediatric Allergy and Immunology : Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 21(6), 977–982. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3038.2010.00995.X>
- Perrella, S., Gridneva, Z., Lai, C. T., Stinson, L., George, A., Bilston-John, S., & Geddes, D. (2021). Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. *Seminars in Perinatology*, 45(2). <https://doi.org/10.1016/J.SEMPERI.2020.151380>
- Plaza-Díaz, J., Fontana, L., & Gil, A. (2018). Human milk oligosaccharides and immune system development. *Nutrients*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/NU10081038>
- Pullen, K. M., Atyeo, C., Collier, A. R. Y., Gray, K. J., Belfort, M. B., Lauffenburger, D. A., Edlow, A. G., & Alter, G. (2021). Selective functional antibody transfer into the breastmilk after SARS-CoV-2 infection. *Cell Reports*, 37(6). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109959>
- Quin, C., & Gibson, D. L. (2019). Dietary Fatty Acids and Host-Microbial Crosstalk in Neonatal Enteric Infection. *Nutrients*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/NU11092064>
- Quitadamo, P. A., Comegna, L., & Cristalli, P. (2021). Anti-Infective, Anti-Inflammatory, and Immunomodulatory Properties of Breast Milk Factors for the Protection of Infants in the Pandemic From COVID-19. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2020.589736>

- Reed, J. R., & Schwertfeger, K. L. (2010). Immune cell location and function during post-natal mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(3), 329–339. <https://doi.org/10.1007/S10911-010-9188-7>
- Riskin, A., Almog, M., Peri, R., Halasz, K., Srugo, I., & Kessel, A. (2012). Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatric Research*, 71(2), 220–225. <https://doi.org/10.1038/PR.2011.34>
- Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L., & McCartney, A. L. (2010). Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 11), 3329–3341. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.043224-0>
- Rogier, E. W., Frantz, A. L., Bruno, M. E. C., Wedlund, L., Cohen, D. A., Stromberg, A. J., & Kaetzel, C. S. (2014). Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8), 3074–3079. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1315792111/-/DCSUPPLEMENTAL/SAPP.PDF>
- Rueda, R. (2007). The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. *The British Journal of Nutrition*, 98 Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0007114507832946>
- Sakarya, S., & Öncü, S. (2003). Bacterial adhesins and the role of sialic acid in bacterial adhesion. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 9(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12640357/>
- Salvatori, G., De Rose, D. U., Concato, C., Alario, D., Olivini, N., Dotta, A., & Campana, A. (2020). Managing COVID-19-Positive Maternal-Infant Dyads: An Italian Experience. *Breastfeeding Medicine : The Official Journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, 15(5), 347–348. <https://doi.org/10.1089/BFM.2020.0095>

- Schack, L., Stapulionis, R., Christensen, B., Kofod-Olsen, E., Skov Sørensen, U. B., Vorup-Jensen, T., Sørensen, E. S., & Höllsberg, P. (2009). Osteopontin enhances phagocytosis through a novel osteopontin receptor, the alphaXbeta2 integrin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(11), 6943–6950. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0900065>
- Schlaudecker, E. P., Steinhoff, M. C., Omer, S. B., McNeal, M. M., Roy, E., Arifeen, S. E., Dodd, C. N., Raqib, R., Breiman, R. F., & Zaman, K. (2013). IgA and neutralizing antibodies to influenza a virus in human milk: a randomized trial of antenatal influenza immunization. *PloS One*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0070867>
- Schlievert, P. M., Kilgore, S. H., Seo, K. S., & Leung, D. Y. M. (2019). Glycerol Monolaurate Contributes to the Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity of Human Milk. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-51130-Y>
- Schlievert, P. M., & Peterson, M. L. (2012). Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PloS One*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040350>
- Schnabl, K. L., Larsen, B., Van Aerde, J. E., Lees, G., Evans, M., Belosevic, M., Field, C., Thomson, A. B. R., & Clandinin, M. T. (2009). Gangliosides protect bowel in an infant model of necrotizing enterocolitis by suppressing proinflammatory signals. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(4), 382–392. <https://doi.org/10.1097/MPG.0B013E3181B6456D>
- Schoggins, J. W., & Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology*, 1(6), 519–525. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2011.10.008>
- Schwab, C., Ruscheweyh, H. J., Bunesova, V., Pham, V. T., Beerenwinkel, N., & Lacroix, C. (2017). Trophic Interactions of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii* during L-Fucose and Fucosyllactose Degradation. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00095>

- Schwab, C., Voney, E., Ramirez Garcia, A., Vischer, M., & Lacroix, C. (2019). Characterization of the Cultivable Microbiota in Fresh and Stored Mature Human Breast Milk. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02666>
- Serrano, G., Kochergina, I., Albors, A., Diaz, E., Oroval, M., Hueso, G., & Serrano, J. M. (2020). Liposomal Lactoferrin as Potential Preventative and Cure for COVID-19. *International Journal of Research in Health Sciences*, *8*(1), 08–15. <https://doi.org/10.5530/ijrhs.8.1.3>
- Sfeir, R. M., Dubarry, M., Boyaka, P. N., Rautureau, M., & Tomé, D. (2004). The mode of oral bovine lactoferrin administration influences mucosal and systemic immune responses in mice. *The Journal of Nutrition*, *134*(2), 403–409. <https://doi.org/10.1093/JN/134.2.403>
- Shin, S. Y., Bajpai, V. K., Kim, H. R., & Kang, S. C. (2007). Antibacterial activity of bioconverted eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) against foodborne pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *113*(2), 233–236. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.05.020>
- Siqueiros-Cendón, T., Arévalo-Gallegos, S., Iglesias-Figueroa, B. F., García-Montoya, I. A., Salazar-Martínez, J., & Rascón-Cruz, Q. (2014). Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacologica Sinica*, *35*(5), 557–566. <https://doi.org/10.1038/APS.2013.200>
- Smith, I. A., Knezevic, B. R., Ammann, J. U., Rhodes, D. A., Aw, D., Palmer, D. B., Mather, I. H., & Trowsdale, J. (2010). BTN1A1, the mammary gland butyrophilin, and BTN2A2 are both inhibitors of T cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *184*(7), 3514–3525. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0900416>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6145), 569–573. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1241165>

- Snow, D. R., Ward, R. E., Olsen, A., Jimenez-Flores, R., & Hintze, K. J. (2011). Membrane-rich milk fat diet provides protection against gastrointestinal leakiness in mice treated with lipopolysaccharide. *Journal of Dairy Science*, *94*(5), 2201–2212. <https://doi.org/10.3168/JDS.2010-3886>
- Stabler, T. V., Huang, Z., Montell, E., Vergés, J., & Kraus, V. B. (2017). Chondroitin sulphate inhibits NF- $\kappa$ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. *Osteoarthritis and Cartilage*, *25*(1), 166–174. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2016.08.012>
- Sydora, B. C., Tavernini, M. M., Wessler, A., Jewell, L. D., & Fedorak, R. N. (2003). Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. *Inflammatory Bowel Diseases*, *9*(2), 87–97. <https://doi.org/10.1097/00054725-200303000-00002>
- Taube, S., Perry, J. W., Yetming, K., Patel, S. P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H. F., Lee, C. H., Connell, T. D., Shayman, J. A., & Wobus, C. E. (2009). Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *Journal of Virology*, *83*(9), 4092–4101. <https://doi.org/10.1128/JVI.02245-08>
- Telang, S. (2018). Lactoferrin: A Critical Player in Neonatal Host Defense. *Nutrients*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/NU10091228>
- Thai, J. D., & Gregory, K. E. (2020). Bioactive Factors in Human Breast Milk Attenuate Intestinal Inflammation during Early Life. *Nutrients*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/NU12020581>
- Thum, C., Wall, C., Day, L., Szeto, I. M. Y., Li, F., Yan, Y., & Barnett, M. P. G. (2022). Changes in Human Milk Fat Globule Composition Throughout Lactation: A Review. *Frontiers in Nutrition*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.835856>
- Timby, N., Domellöf, M., Lif Holgerson, P., West, C. E., Lönnerdal, B., Hernell, O., & Johansson, I. (2017). Oral Microbiota in Infants Fed a Formula Supplemented with

- Bovine Milk Fat Globule Membranes - A Randomized Controlled Trial. *PloS One*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0169831>
- Timby, N., Hernell, O., Vaarala, O., Melin, M., Lönnerdal, B., & Domellöf, M. (2015). Infections in infants fed formula supplemented with bovine milk fat globule membranes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 60(3), 384–389. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000624>
- Torow, N., Yu, K., Hassani, K., Freitag, J., Schulz, O., Basic, M., Brennecke, A., Sparwasser, T., Wagner, N., Bleich, A., Lochner, M., Weiss, S., Förster, R., Pabst, O., & Hornef, M. W. (2015). Active suppression of intestinal CD4(+)TCR $\alpha\beta$ (+) T-lymphocyte maturation during the postnatal period. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS8725>
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 3(2), 133–146. <https://doi.org/10.1038/NRI1001>
- Underwood, M. A., Arriola, J., Gerber, C. W., Kaveti, A., Kalanetra, K. M., Kananurak, A., Bevins, C. L., Mills, D. A., & Dvorak, B. (2014). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* in experimental necrotizing enterocolitis: alterations in inflammation, innate immune response, and the microbiota. *Pediatric Research*, 76(4), 326–333. <https://doi.org/10.1038/PR.2014.102>
- Urbaniak, C., Angelini, M., Gloor, G. B., & Reid, G. (2016). Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*, 4. <https://doi.org/10.1186/S40168-015-0145-Y>
- Ustundag, B., Yilmaz, E., Dogan, Y., Akarsu, S., Canatan, H., Halifeoglu, I., Cikim, G., & Denizmen Aygun, A. (2005). Levels of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators of Inflammation*, 2005(6), 331–336. <https://doi.org/10.1155/MI.2005.331>

- Vassilopoulou, E., Feketea, G., Koumbi, L., Mesriari, C., Berghea, E. C., & Konstantinou, G. N. (2021). Breastfeeding and COVID-19: From Nutrition to Immunity. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.661806>
- Velupillai, P., & Harn, D. A. (1994). Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(1), 18–22. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.1.18>
- Wang, C., Qiao, X., Gao, Z., Jiang, L., & Mu, Z. (2022). Advancement on Milk Fat Globule Membrane: Separation, Identification, and Functional Properties. *Frontiers in Nutrition*, *8*. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.807284>
- Wang, C., Zhang, M., Guo, H., Yan, J., Liu, F., Chen, J., Li, Y., & Ren, F. (2019). Human Milk Oligosaccharides Protect against Necrotizing Enterocolitis by Inhibiting Intestinal Damage via Increasing the Proliferation of Crypt Cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, *63*(18). <https://doi.org/10.1002/MNFR.201900262>
- Wardzala, C. L., Wood, A. M., Belnap, D. M., & Kramer, J. R. (2022). Mucins Inhibit Coronavirus Infection in a Glycan-Dependent Manner. *ACS Central Science*, *8*(3), 351–360. <https://doi.org/10.1021/ACSCENTSCI.1C01369>
- Welch, J. L., Xiang, J., Okeoma, C. M., Schlievert, P. M., & Stapleton, J. T. (2020). Glycerol Monolaurate, an Analogue to a Factor Secreted by Lactobacillus, Is Virucidal against Enveloped Viruses, Including HIV-1. *MBio*, *11*(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00686-20>
- West, C. E., Kvistgaard, A. S., Peerson, J. M., Donovan, S. M., Peng, Y. M., & Lönnerdal, B. (2017). Effects of osteopontin-enriched formula on lymphocyte subsets in the first 6 months of life: a randomized controlled trial. *Pediatric Research*, *82*(1), 63–71. <https://doi.org/10.1038/PR.2017.77>
- Woo, S. H., Lee, S. H., Park, J. W., Go, D. M., & Kim, D. Y. (2019). Osteopontin Protects Colonic Mucosa from Dextran Sodium Sulfate-Induced Acute Colitis in Mice by

Regulating Junctional Distribution of Occludin. *Digestive Diseases and Sciences*, 64(2), 421–431. <https://doi.org/10.1007/S10620-018-5246-6>

Wu, R. Y., Li, B., Koike, Y., Määttä, P., Miyake, H., Cadete, M., Johnson-Henry, K. C., Botts, S. R., Lee, C., Abrahamsson, T. R., Landberg, E., Pierro, A., & Sherman, P. M. (2019). Human Milk Oligosaccharides Increase Mucin Expression in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(3). <https://doi.org/10.1002/MNFR.201800658>

Wu, S. C., Arthur, C. M., Wang, J., Verkerke, H., Josephson, C. D., Kalman, D., Roback, J. D., Cummings, R. D., & Stowell, S. R. (2021). The SARS-CoV-2 receptor-binding domain preferentially recognizes blood group A. *Blood Advances*, 5(5), 1305–1309. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020003259>

Xiao, L., van De Worp, W. R. P. H., Stassen, R., van Maastricht, C., Kettelarij, N., Stahl, B., Blijenberg, B., Overbeek, S. A., Folkerts, G., Garsen, J., & van't Land, B. (2019). Human milk oligosaccharides promote immune tolerance via direct interactions with human dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 49(7), 1001–1014. <https://doi.org/10.1002/EJI.201847971>

Xu, Y., Wang, Y., He, J., & Zhu, W. (2022). Antibacterial properties of lactoferrin: A bibliometric analysis from 2000 to early 2022. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.947102>

Yeoh, Y. K., Zuo, T., Lui, G. C. Y., Zhang, F., Liu, Q., Li, A. Y. L., Chung, A. C. K., Cheung, C. P., Tso, E. Y. K., Fung, K. S. C., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D. S. C., Chow, K. M., Ng, S. S. S., Li, T. C. M., Ng, R. W. Y., Yip, T. C. F., ... Ng, S. C. (2021). Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*, 70(4), 698–706. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2020-323020>

Zhang, H., Wei, H., Cui, Y., Zhao, G., & Feng, F. (2009). Antibacterial interactions of monolaurin with commonly used antimicrobials and food components. *Journal of Food Science*, 74(7). <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2009.01300.X>

- Zhao, P., Praissman, J. L., Grant, O. C., Cai, Y., Xiao, T., Rosenbalm, K. E., Aoki, K., Kellman, B. P., Bridger, R., Barouch, D. H., Brindley, M. A., Lewis, N. E., Tiemeyer, M., Chen, B., Woods, R. J., & Wells, L. (2020). Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. *Cell Host & Microbe*, 28(4), 586-601.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2020.08.004>
- Zhao, Y., Kuang, M., Li, J., Zhu, L., Jia, Z., Guo, X., Hu, Y., Kong, J., Yin, H., Wang, X., & You, F. (2021). SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Research*, 31(7), 818–820. <https://doi.org/10.1038/S41422-021-00495-9>
- Zheng, Y., Correa-Silva, S., Palmeira, P., & Carneiro-Sampaio, M. (2022). Maternal vaccination as an additional approach to improve the protection of the nursling: Anti-infective properties of breast milk. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 77. <https://doi.org/10.1016/J.CLINSP.2022.100093>
- Zhu, C., Liu, W., Su, H., Li, S., Shereen, M. A., Lv, Z., Niu, Z., Li, D., Liu, F., Luo, Z., & Xia, Y. (2020). Breastfeeding Risk from Detectable Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Breastmilk. *The Journal of Infection*, 81(3), 452–482. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2020.06.001>
- Zimmermann, P., & Curtis, N. (2020). Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *The Journal of Infection*, 81(1), 17–47. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2020.01.023>
- Zuo, T., Zhang, F., Lui, G. C. Y., Yeoh, Y. K., Li, A. Y. L., Zhan, H., Wan, Y., Chung, A. C. K., Cheung, C. P., Chen, N., Lai, C. K. C., Chen, Z., Tso, E. Y. K., Fung, K. S. C., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D. S. C., Chan, F. K. L., ... Ng, S. C. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*, 159(3), 944-955.e8. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2020.05.048>