

# Proyecto internacional INSPIRE: «¿Qué es normal en la leche humana» (II). Compuestos inmunológicos solubles

L. Ruiz<sup>1,2</sup>, C. García-Carral<sup>2,3</sup>, M.A. Checa<sup>4</sup>, J. Mínguez<sup>5</sup>, C. Legarra<sup>6</sup>, M.K. McGuire<sup>7</sup>, C.L. Meehan<sup>8</sup>, L. Bode<sup>9</sup>, L. Fernández<sup>2</sup>, I. Espinosa-Martos<sup>2,3</sup>, J.M. Rodríguez<sup>2</sup>; Consorcio INSPIRE

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Villaviciosa (Asturias). <sup>2</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

<sup>3</sup>Probisearch. Tres Cantos (Madrid). <sup>4</sup>Centro de Atención Primaria Arrabal. Zaragoza. <sup>5</sup>Hospital Materno-Infantil. Barbastro (Huesca).

<sup>6</sup>Ambulatorio de Durango. OSI Galdakao-Barrualde. Vizcaya. <sup>7</sup>School of Biological Sciences. Washington State University. Pullman (Estados Unidos). <sup>8</sup>Department of Anthropology. Washington State University. Pullman (Estados Unidos). <sup>9</sup>Department of Pediatrics, University of California. San Diego (Estados Unidos)

## Resumen

La protección inmunológica del recién nacido depende principalmente de factores inmunitarios maternos proporcionados a través de la leche. Sin embargo, muy pocos estudios han evaluado la variabilidad natural de los diferentes compuestos inmunitarios presentes en la leche humana de mujeres sanas pertenecientes a poblaciones heterogéneas. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue la detección y cuantificación de una amplia gama de factores inmunitarios solubles, entre los que se incluyen factores de inmunidad innata (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) y adquirida (IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17), quimioquinas (IL-8, Gro $\alpha$ , MCP1, MIP1 $\beta$ ), factores de crecimiento (IL-5, IL-7, EGF, G-CSF, GM-CSF, TGF $\beta$ 2) e inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM), en la leche producida por mujeres sanas de diversas etnias procedentes de distintos entornos geográficos, dietéticos, socioeconómicos y ambientales. A partir de los resultados de este trabajo, pudimos determinar que un grupo de estos factores (IgA, IgG, IgM, EGF, TGF $\beta$ 2, IL-7, IL-8, Gro $\alpha$  y MIP1 $\beta$ ) estaba presente en todas o en la mayoría de las muestras recogidas en todas las cohortes y, por tanto, podría considerarse como el núcleo común (*core*) de la leche humana en condiciones fisiológicas.

©2020 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

## Palabras clave

Lactancia, leche humana, inmunoglobulinas, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento.

## Introducción

Durante el embarazo, las células B y T maternas se dirigen selectivamente desde la sangre y las superficies mucosas, in-

## Abstract

**Title:** Project INSPIRE: «What's normal in human milk?» (II). Soluble immune factors

Newborn immune protection mostly relies on maternal immune factors provided through milk. However, studies dealing with an in-depth profiling of the different immune compounds present in human milk and with the assessment of their natural variation in healthy women from different populations are very scarce. In this context, the objective of this work was the detection and quantification of a wide array of immune compounds, including innate immunity factors (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), acquired immunity factors (IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17), chemokines (IL-8, Gro $\alpha$ , MCP1, MIP1 $\beta$ ), growth factors (IL-5, IL-7, EGF, G-CSF, GM-CSF, TGF $\beta$ 2), and immunoglobulins (IgA, IgG, IgM), in milk produced by healthy women of different ethnicities living in different geographic, dietary, socio-economic, and environmental settings. Among the analyzed factors (IgA, IgG, IgM, EGF, TGF $\beta$ 2, IL-7, IL-8, Gro $\alpha$ , and MIP1 $\beta$ ) were detected in all or most of the samples collected in each population and, therefore, this specific set of compounds might be considered as a universal *core* of soluble immune factors in milk produced by healthy women worldwide.

©2020 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

## Keywords

Breastfeeding, human milk, lactation, immunoglobulins, cytokines, chemokines, growth factors.

cludidas las de los tractos digestivo y respiratorio, a la glándula mamaria, donde producen una amplia gama de factores inmunes que se transfieren a través del calostro y la leche, y que son esenciales para la protección y el correcto desarrollo del

Fecha de recepción: 4/02/19. Fecha de aceptación: 6/02/19.

**Correspondencia:** J.M. Rodríguez. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Correo electrónico: jmrodrig@ucm.es

neonato<sup>1,2</sup>. Por tanto, se considera que la glándula mamaria constituye una parte muy relevante del sistema inmunitario del lactante, ya que a través del calostro y la leche proporciona el vínculo posnatal que promueve el «diálogo» inmunitario maternoinfantil<sup>3</sup>. Los efectos de esta programación son duraderos y, de hecho, la lactancia materna se ha asociado a una reducción significativa de las tasas de enfermedades alérgicas y respiratorias durante la edad adulta<sup>4</sup>.

Las inmunoglobulinas (Ig) son los factores inmunitarios más abundantes y estudiados en la leche humana. La IgA dimerica y la IgM pentamérica confieren protección frente a los antígenos a los que se han expuesto las mucosas de la madre y, por tanto, a los que es muy probable que se exponga el lactante durante las primeras etapas de su vida<sup>3,5</sup>. Diversas citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, igualmente presentes en la leche humana, contribuyen a la diferenciación de las células productoras de IgA, desempeñando un papel fundamental en la maduración del sistema inmunitario asociado al tracto gastrointestinal infantil y en la protección del recién nacido frente a enfermedades infecciosas<sup>6</sup>.

Ciertos factores maternos, como la duración de la gestación, el modo de parto, la dieta, el tiempo posparto o las exposiciones antigénicas previas, parecen influir en la composición inmunológica de la leche humana<sup>7-9</sup>. Por tanto, es razonable suponer que las concentraciones de estas sustancias en la leche producida por mujeres sanas pueden depender de las circunstancias de la vida de cada mujer. Sin embargo, los estudios previos sobre la composición inmunológica de la leche humana tienen las limitaciones de haber evaluado un número reducido de factores inmunitarios, de haber reclutado mujeres de una misma etnia y localización geográfica y/o de que el tamaño muestral era relativamente pequeño<sup>10-13</sup>. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de un amplio espectro de compuestos inmunológicos, que incluyen factores de inmunidad innata, factores de inmunidad adquirida, quimioquinas, factores de crecimiento e Ig en la leche producida por mujeres sanas de diferentes etnias que viven en entornos geográficos, dietéticos, socioeconómicos y ambientales muy diferentes.

## Análisis inmunológicos

Como se indicó en el artículo anterior, la muestra original incluía 2 cohortes europeas (España [n= 41] y Suecia [n= 24]), 1 sudamericana (Perú [n= 43]), 2 norteamericanas (Estados Unidos-Washington [n=41] y Estados Unidos-California [n=19]) y 6 africanas (Etiopía rural [n= 40], Etiopía urbana [n= 40], Gambia rural [n= 40], Gambia urbana [n= 40], Ghana [n= 40] y Kenia [n= 42]). Sin embargo, las muestras recogidas de la cohorte de Etiopía rural no se pudieron analizar en este trabajo, ya que fueron las únicas que se conservaron inicialmente utilizando un conservante químico (al no haber congeladores disponibles en el lugar de recogida), el cual interfiere en las determinaciones inmunológicas. Por tanto, el análisis inmunológico se realizó con un total de 370 muestras de leche.

Las concentraciones de factores relacionados con la inmunidad innata (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) y la adquirida (IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17), quimioquinas (IL8, Gro $\alpha$ , MCP1, MIP1 $\beta$ ) y factores de crecimiento (IL-5, IL-7, G-CSF, GM-CSF, TGF $\beta$ 2) se determinaron mediante inmunoensayos multiplex basados en cuentas magnéticas, usando el equipo Bioplex 200 (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) y los *kits* Bio-PlexPro Human Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el caso particular de la determinación del factor TGF $\beta$ 2, este fue activado mediante un tratamiento ácido previo a la realización de la inmunodeterminación, siguiendo las instrucciones del fabricante. El EGF se determinó mediante ELISA usando el *kit* RayBio Human EGF ELISA (RayBiotech, Norcross, GA, Estados Unidos). Las concentraciones de inmunoglobulinas (IgA, IgG total e IgM) se determinaron usando el *kit* Bio-Plex Pro Human Isotyping (Bio-Rad) y el equipo Bioplex.

Antes de su análisis, las muestras (~1 mL) se procesaron tal como se ha descrito en un trabajo anterior<sup>14</sup>. Cada ensayo se realizó por duplicado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se realizaron curvas estándares para cada analito en cada ensayo. Las concentraciones de citoquinas se expresaron en nanogramos por litro (ng/L), las concentraciones de Ig en miligramos por litro (mg/L) y las concentraciones de EGF, TGF $\beta$ 2 y Gro $\alpha$  como microgramos por litro ( $\mu$ g/L). Los coeficientes de variación interensayo estuvieron por debajo de los límites máximos recomendados por los fabricantes para todos los parámetros. Los límites de detección del ensayo para cada analito están recogidos en el estudio de Ruiz et al.<sup>15</sup>, y el análisis estadístico de los datos obtenidos en el presente trabajo se realizó de la forma descrita por dichos autores<sup>15</sup>. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un valor de  $p < 0,05$  para todos los análisis. Todos los análisis se realizaron con el software R versión 3.3.2 (R-project, <http://www.r-project.org>).

## Resultados

### **Análisis de los datos de salud materna, salud infantil, estilo de vida y antropometría**

El análisis de los datos mediante la prueba de suma de rangos de Friedman reveló diferencias significativas en diversos parámetros demográficos, médicos, antropométricos y de estilo de vida entre todas las poblaciones (tabla 1). Las diferencias más notables incluyeron: a) edad materna, que osciló entre los 34 años (mediana) de la cohorte española y los 20,5 años (mediana) de la cohorte etíope rural; b) días posparto en el momento de la recolección de la muestra, que oscilaron entre los 42 días (mediana) de la cohorte de Suecia y los 74 días (mediana) de la cohorte de Kenia, y c) tasa de cesáreas, que osciló entre el 48,8% en la cohorte de Perú y el 0% en las cohortes rurales de Etiopía y Gambia. Globalmente, la tasa de medicación infantil más alta correspondió a la cohorte keniana (88,5%), mientras que la medicación materna fue más frecuen-

TABLA 1

## Principales características de las poblaciones analizadas en el estudio

Parámetro	Etiopía		Gambia		Estados Unidos					
	Rural (n= 40)	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	Ghana (n= 40)	Kenia (n= 42)	Perú (n= 43)	España (n= 41)	Suecia (n= 24)	Washington (n= 41)	California (n= 19)
Índice de desarrollo (OMS)	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Bajo	Alto	Muy alto	Muy alto	Muy alto	Muy alto
Animales en casa	15	22	3	5	5	58	39	42	39	34
Cesárea	0	0	3	15	22	49	10	21	37	19
IMC materno	Bajo	3	13	5	2	2	0	0	0	0
	Normal	82	74	65	50	70	30	75	54	16
	Sobrepeso	15	13	25	35	20	33	15	25	42
	Obesidad	0	0	5	13	8	37	10	21	42
Edad materna (años)	≤24	85	45	36	25	52	46	2	12	16
	>24-≤31	12	29	46	45	33	30	12	46	58
	≥31	3	26	18	30	14	23	85	42	26
Medicación materna (preparto, parto y posparto)	Profilaxis intraparto	5	5	15	22	33	33	34	21	21
	Sin medicación	67	50	45	50	41	33	22	37	5
Tiempo posparto (días)	≤46	30	18	23	40	17	23	19	63	37
	>46-≤63	28	28	27	15	21	30	24	25	21
	>63-≤77	42	31	25	30	17	26	15	8	10
	>77	0	23	25	15	45	21	42	4	32
Tiempo desde la última toma (min)	<30	10	ND	ND	57	10	2	5	12	11
	>30-60	20	ND	ND	35	90	19	35	4	11
	>60-120	28	ND	ND	5	0	63	35	46	50
	>120	42	ND	ND	3	0	16	25	38	28

Los valores se expresan en porcentajes.  
IMC: índice de masa corporal; ND: no disponible; OMS: Organización Mundial de la Salud.

te en la cohorte de Estados Unidos-Washington, en la que el 56,1% de las madres recibieron medicación durante el embarazo o el parto (distinta de la profilaxis antibiótica intraparto) y el 91% de ellas declaró que habían recibido algún tipo de medicación (en la mayor parte de los casos analgésicos) durante el periodo posparto.

### Frecuencia de detección de los compuestos inmunológicos en las muestras de leche

Todos los factores inmunológicos estudiados pudieron detectarse en, al menos, algunas de las muestras analizadas, aunque sus frecuencias de detección y sus concentraciones fueron muy variables, entre distintas mujeres y poblaciones, según cada factor. Globalmente, la IgA y el EGF mostraron las frecuencias de detección más altas (100% de las muestras), seguidas por IgG, IgM, TGFβ2, IL-7, IL-8 y Groα, que se detectaron en la mayoría de las muestras recogidas en cada cohorte (tabla 2). La frecuencia de detección de MIP1β fue elevada (>91%) en todas las poblaciones, con excepción de las muestras procedentes de la cohorte de Estados Unidos-Washington (51%).

IL-1β, TNFα, GCSF, IL-6, IL-13 y MCP1 también se detectaron en todas las poblaciones, pero sus frecuencias variaron en función de cada cohorte. Algunos compuestos inmunitarios mostraron frecuencias intermedias de detección en ciertos lugares, pero no pudieron detectarse entre las muestras recolectadas en otros; entre ellos se encuentran la IL-2 (que únicamente se pudo detectar en algunas muestras de Ghana), la IL-4 (que no se detectó en las muestras de Estados Unidos-Washington, Suecia y Gambia urbana), la IL-10 (no detectada en las muestras de Estados Unidos-California, Estados Unidos-Washington y Suecia), la IL-17 (no detectada en Estados Unidos-Washington y Suecia), la IL-5 (no detectada en las muestras de Estados Unidos-Washington, Suecia y Gambia urbana), la IL-12 (no detectada en Estados Unidos-Washington) y el INFγ (no detectado en Estados Unidos-Washington). Finalmente, se encontraron bajas frecuencias de detección para GM-CSF, que se detectó en menos del 10% de las muestras de cada grupo, excepto en las de Ghana, donde se detectó en el 50% de las muestras, y en las de Estados Unidos-California, Estados Unidos-Washington y Suecia, donde este factor no se pudo detectar en ninguna muestra.

**TABLA 2**
**Frecuencias relativas de detección de cada factor inmunitario en las muestras de cada cohorte**

Parámetro	Etiopía		Gambia			Estados Unidos				
	Rural (n= 40)	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	Ghana (n= 40)	Kenia (n= 42)	Perú (n= 43)	España (n= 41)	Suecia (n= 24)	Washington (n= 41)	California (n= 19)
IL-1 $\beta$	73 <sup>a</sup>	83 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	56 <sup>a,b</sup>	58 <sup>a,b</sup>	84 <sup>a</sup>	24 <sup>b</sup>
IL-6	35 <sup>a,b</sup>	75 <sup>a</sup>	50 <sup>a,b</sup>	33 <sup>a,b</sup>	69 <sup>a</sup>	42 <sup>a,b</sup>	41 <sup>a,b</sup>	33 <sup>a,b</sup>	47 <sup>a,b</sup>	19 <sup>b</sup>
IL-12	13 <sup>a</sup>	68 <sup>b,c</sup>	30 <sup>a,b</sup>	75 <sup>c</sup>	24 <sup>a</sup>	74 <sup>c</sup>	17 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
INF $\gamma$	25 <sup>a,b</sup>	40 <sup>a</sup>	18 <sup>a,b</sup>	18 <sup>a,b</sup>	26 <sup>a,b</sup>	26 <sup>a,b</sup>	2 <sup>b</sup>	8 <sup>a,b</sup>	10 <sup>a,b</sup>	0 <sup>b</sup>
TNF $\alpha$	100 <sup>a</sup>	83 <sup>a,b</sup>	30 <sup>c</sup>	85 <sup>a,b</sup>	62 <sup>a-c</sup>	39 <sup>b,c</sup>	44 <sup>b,c</sup>	67 <sup>a-c</sup>	79 <sup>a-c</sup>	76 <sup>a-c</sup>
IL-2	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0
IL-4	33 <sup>a</sup>	23 <sup>a,b</sup>	0 <sup>b,c</sup>	33 <sup>a</sup>	14 <sup>a-c</sup>	7 <sup>b,c</sup>	2 <sup>b,c</sup>	0 <sup>c</sup>	5 <sup>b,c</sup>	0 <sup>c</sup>
IL-10	63 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	79 <sup>a</sup>	78 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
IL-13	100 <sup>a</sup>	68 <sup>a,b</sup>	45 <sup>b</sup>	68 <sup>a,b</sup>	67 <sup>a,b</sup>	86 <sup>a,b</sup>	83 <sup>a,b</sup>	50 <sup>b</sup>	53 <sup>a,b</sup>	66 <sup>b</sup>
IL-17	10	15	8	18	21	9	5	0	5	0
IL-5	43 <sup>a,b,d</sup>	65 <sup>b,d</sup>	0 <sup>c</sup>	15 <sup>a,c</sup>	60 <sup>b,d</sup>	5 <sup>c</sup>	7 <sup>a,c</sup>	8 <sup>a,c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
IL-7	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>	73 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
IgA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IgM	100	100	100	100	100	98	100	96	100	100
IgG	100	100	100	100	100	98	100	96	100	100
TGF $\beta$ 2	100	100	100	100	100	100	100	96	100	100
IL-8	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>
GRO $\alpha$	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	88 <sup>a,b</sup>
MCP1	85 <sup>a,b</sup>	85 <sup>a,b</sup>	83 <sup>a,b</sup>	95 <sup>a</sup>	90 <sup>a,b</sup>	65 <sup>a,b</sup>	78 <sup>a,b</sup>	46 <sup>b,c</sup>	58 <sup>a-c</sup>	17 <sup>c</sup>
MIP1 $\beta$	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	51 <sup>b</sup>
GCSF	93 <sup>a</sup>	73 <sup>a</sup>	25 <sup>b,c</sup>	98 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	79 <sup>a</sup>	71 <sup>a</sup>	50 <sup>a-c</sup>	63 <sup>a,b</sup>	10 <sup>c</sup>
GMCSF	10 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
EGF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Los valores que no comparten un superíndice común (dentro de cada fila) son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

IL-2, IL-17 e IL-4 también se encontraron en frecuencias muy bajas (<18, 22 y 33%, respectivamente) en todas las ubicaciones.

### **Cuantificación de los compuestos inmunológicos relacionados con la inmunidad innata y la adquirida**

Los niveles de todos los factores inmunitarios analizados en este estudio, en cada cohorte evaluada, se muestran en las tablas 3-5. Respecto a los relacionados con la inmunidad innata, las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF $\alpha$  mostraron diferencias significativas cuando se compararon las distintas cohortes; en contraste, las de INF $\gamma$  fueron relativamente uniformes en todas las cohortes. Las muestras de España destacaron por presentar concentraciones elevadas de IL-6 e IL-1 $\beta$ .

Respecto a los factores relacionados con la inmunidad adquirida, las concentraciones más elevadas de IgA se encontraron en las muestras de Suecia y de las 2 cohortes estadouni-

denses, con concentraciones (medianas) que oscilaban entre 1.210 y 1.840 mg/L. Curiosamente, las muestras de estos mismos lugares contenían las concentraciones más bajas de IgG e IgM, que variaban entre 15,31 y 32,37 mg/L y entre 12,27 y 18,95 mg/L, respectivamente. Entre los otros factores relacionados con la inmunidad adquirida, las concentraciones de IL-4, IL-10, IL-13 y TGF $\beta$ 2 fueron diferentes en todas las cohortes, pero no se observaron patrones claros, a excepción de las de IL-10 en las muestras de Suecia y de las 2 cohortes estadounidenses, cuyos valores estaban por debajo del límite de detección del ensayo. Las concentraciones de IL-7 fueron menores en esas 3 mismas cohortes y en la de Gambia rural (rango: 11,10-13,92 ng/L), en comparación con las de otras ubicaciones (rango: 32,14-91,61 ng/L), con la excepción de las de Ghana (mediana: 2,39 ng/L). En relación con esta última cohorte, los niveles de los factores relacionados con la inmunidad adquirida fueron bastante diferentes en comparación con los de las otras cohortes africanas, ya que presentaron las concentraciones más bajas de IL-13 e IL-7 y las concentraciones más

TABLA 3

**Concentración (mediana, ng/L) de los factores inmunitarios relacionados con la inmunidad innata en las muestras analizadas**

Parámetro	Etiopía		Gambia			Estados Unidos				
	Rural (n= 40)	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	Ghana (n= 40)	Kenia (n= 42)	Perú (n= 43)	España (n= 41)	Suecia (n= 24)	Washington (n= 41)	California (n= 19)
IL-1 $\beta$	0,57 <sup>a,c</sup>	0,40 <sup>a,c</sup>	0,52 <sup>a,b</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,98 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a,c</sup>	1,14 <sup>a,b</sup>	0,32 <sup>a,c</sup>	0,17 <sup>b,c</sup>	0,12 <sup>c</sup>
IL-6	15,37 <sup>a,b</sup>	7,06 <sup>a,b</sup>	12,51 <sup>a,b</sup>	4,03 <sup>a,b</sup>	12,85 <sup>a</sup>	5,11 <sup>a,c</sup>	12,69 <sup>a</sup>	3,48 <sup>a,b</sup>	3,61 <sup>a,b</sup>	2,13 <sup>b</sup>
IL-12	2,61 <sup>a,b</sup>	4,16 <sup>a</sup>	1,71 <sup>a,b</sup>	2,04 <sup>a,b</sup>	4,46 <sup>a</sup>	1,71 <sup>a,b</sup>	0,86 <sup>b</sup>	0,78 <sup>a,b</sup>	0,77 <sup>a,b</sup>	ND
INF $\gamma$	10,93	26,57	19,25	15,52	31,84	18,33 <sup>c</sup>	4,70	8,06	21,35	ND
TNF $\alpha$	4,67 <sup>a,b</sup>	8,63 <sup>b</sup>	1,27 <sup>a</sup>	4,67 <sup>a,b</sup>	6,83 <sup>a,b</sup>	3,65 <sup>a,c</sup>	3,18 <sup>a</sup>	3,65 <sup>a</sup>	4,98 <sup>a,b</sup>	4,45 <sup>a</sup>

Los valores que no comparten un superíndice común (dentro de cada fila) son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Los rangos intercuartil están recogidos en el estudio de Ruiz et al.<sup>15</sup>. ND: no detectado.

TABLA 4

**Concentración (mediana, ng/L) de los factores inmunitarios relacionados con la inmunidad adquirida en las muestras analizadas**

Parámetro	Etiopía		Gambia			Estados Unidos				
	Rural (n= 40)	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	Ghana (n= 40)	Kenia (n= 42)	Perú (n= 43)	España (n= 41)	Suecia (n= 24)	Washington (n= 41)	California (n= 19)
IL-2	ND	ND	ND	5,62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IL-4	0,41 <sup>a,b</sup>	0,83 <sup>a,b</sup>	ND	0,27 <sup>a</sup>	3,43 <sup>b</sup>	2,34 <sup>a,b</sup>	0,70 <sup>a,b</sup>	ND	1,89	ND
IL-10	4,44 <sup>a,b</sup>	7,07 <sup>a,c</sup>	2,50 <sup>b</sup>	6,68 <sup>a,c</sup>	8,16 <sup>c</sup>	2,34 <sup>b</sup>	3,25 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
IL-13	1,77 <sup>a,c</sup>	1,57 <sup>a,c</sup>	0,78 <sup>a,b</sup>	0,45 <sup>b</sup>	2,73 <sup>c</sup>	2,67 <sup>c</sup>	2,63 <sup>c</sup>	2,06 <sup>a,c</sup>	3,59 <sup>a,c</sup>	2,87 <sup>c</sup>
IL-17	25,55	19,23	50,28	11,66	29,33	2,64	4,29	ND	16,84	ND
IL-5	2,05	2,69	ND	1,77	2,16	4,70	2,57	3,09	ND	ND
IL-7	52,54 <sup>a,d</sup>	32,14 <sup>a,d,e</sup>	13,33 <sup>b</sup>	2,39 <sup>c</sup>	58,99 <sup>a,d</sup>	91,61 <sup>d</sup>	34,56 <sup>a,d,e</sup>	11,15 <sup>b,c,e</sup>	13,92 <sup>a,b</sup>	12,26 <sup>b,c</sup>
IgA	323,22 <sup>a,d</sup>	235,78 <sup>a</sup>	312,22 <sup>a,c,d</sup>	584,75 <sup>b,e</sup>	316,81 <sup>a,d</sup>	499,57 <sup>b,c,f</sup>	418,83 <sup>b,d</sup>	1.840,18 <sup>e</sup>	1.210,59 <sup>e,f</sup>	1.355,60 <sup>e</sup>
IgM	83,93 <sup>a</sup>	37,06 <sup>a,b</sup>	59,45 <sup>a,b</sup>	80,87 <sup>a</sup>	53,70 <sup>a,b</sup>	48,37 <sup>a,b</sup>	38,80 <sup>b,d</sup>	13,54 <sup>c</sup>	12,27 <sup>c,d</sup>	18,95 <sup>c,d</sup>
IgG	96,09 <sup>a,c</sup>	74,73 <sup>a,c</sup>	93,47 <sup>a,c</sup>	142,37 <sup>b</sup>	106,19 <sup>a,b</sup>	73,44 <sup>a,c</sup>	59,95 <sup>c</sup>	15,31 <sup>d</sup>	19,26 <sup>d</sup>	32,67 <sup>d</sup>
TGF $\beta$ 2	1,38 <sup>a,c</sup>	0,71 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a,b</sup>	1,78 <sup>b,c</sup>	0,82 <sup>a,c</sup>	0,70 <sup>a</sup>	1,99 <sup>c</sup>	0,88 <sup>a,b</sup>	1,60 <sup>a,b,c</sup>	1,43 <sup>a,c</sup>

Los valores que no comparten un superíndice común (dentro de cada fila) son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Los rangos intercuartil están recogidos en el estudio de Ruiz et al.<sup>15</sup>. ND: no detectado.

altas de IgA e IgG entre las muestras obtenidas en dicho continente. También cabe destacar que, entre todas las muestras analizadas en este estudio, la IL-2 sólo se pudo detectar precisamente en 7 muestras obtenidas en Ghana. No se encontraron diferencias en las concentraciones de IL-5 e IL-17 entre las muestras en que estos dos factores estaban por encima de los límites de detección del ensayo.

**Cuantificación de las quimioquinas**

Gro $\alpha$  fue la quimioquina más abundante en las muestras de leche analizadas en este estudio y, de hecho, sus niveles fueron 100-500 veces mayores que los obtenidos para el resto de este tipo de compuestos inmunitarios. Las concentraciones de todas las quimioquinas fueron significativamente diferentes en todas las cohortes. La IL-8 mostró las concentraciones más al-

tas (54-98 ng/L) en las muestras de España, Perú y de las ubicaciones africanas, con la excepción, nuevamente, de las procedentes de Ghana (~7 ng/L). Las concentraciones de MCP1 fueron más bajas en las muestras de Suecia y de las 2 cohortes estadounidenses (rango: 14,32-52,60 ng/L), en comparación con las otras cohortes (126-252 ng/L). No se observaron patrones claros en la distribución de las concentraciones de Gro $\alpha$  y MIP1 $\beta$  a través de las cohortes. Globalmente, las muestras kenianas mostraron concentraciones de quimioquinas más altas que las de las restantes cohortes.

**Cuantificación de los factores de crecimiento**

En relación con los factores de crecimiento, no se encontraron diferencias significativas para las concentraciones de GM-CSF, mientras que las de G-CSF y EGF mostraron una variación sig-

TABLA 5

**Concentración (mediana, ng/L) de las quimioquinas y los factores de crecimiento en las muestras analizadas**

Parámetro	Etiopía		Gambia			Estados Unidos				
	Rural (n= 40)	Rural (n= 40)	Urbana (n= 40)	Ghana (n= 40)	Kenia (n= 42)	Perú (n= 43)	España (n= 41)	Suecia (n= 24)	Washington (n= 41)	California (n= 19)
IL-8	54,01 <sup>a,d</sup>	59,56 <sup>a</sup>	98,52 <sup>a</sup>	6,74 <sup>b</sup>	85,62 <sup>a</sup>	67,90 <sup>a,c</sup>	72,08 <sup>a,c</sup>	11,66 <sup>b</sup>	22,30 <sup>b,c,d</sup>	5,19 <sup>b</sup>
GRO $\alpha$	5,63 <sup>a,d</sup>	4,19 <sup>a,b</sup>	1,36 <sup>b,c</sup>	0,27 <sup>c</sup>	8,96 <sup>a</sup>	11,01 <sup>a,b</sup>	6,19 <sup>a,d</sup>	1,31 <sup>b,d,e</sup>	3,82 <sup>a,b</sup>	0,34 <sup>c,e</sup>
MCP1	132,62 <sup>a,b</sup>	175,50 <sup>a,b</sup>	147,31 <sup>a,b</sup>	126,00 <sup>a,b</sup>	252,51 <sup>a</sup>	148,70 <sup>a,b</sup>	156,57 <sup>a,b</sup>	35,18 <sup>b</sup>	52,60 <sup>a,b</sup>	14,31 <sup>b</sup>
MIP1 $\beta$	24,75 <sup>a,d</sup>	23,01 <sup>a,b</sup>	9,48 <sup>b,c</sup>	4,24 <sup>c,e</sup>	33,11 <sup>a</sup>	14,24 <sup>b,d</sup>	30,70 <sup>a,d</sup>	9,42 <sup>b,c</sup>	19,12 <sup>a,b,d</sup>	2,85 <sup>e</sup>
GCSF	79,91 <sup>a</sup>	51,38 <sup>a,b</sup>	48,19 <sup>a,b</sup>	47,10 <sup>a,b</sup>	47,32 <sup>a,b</sup>	50,20 <sup>a,b</sup>	18,33 <sup>b,d</sup>	1,29 <sup>c</sup>	3,11 <sup>c,d</sup>	0,85 <sup>c</sup>
GMCSF	8,63	9,99	13,44	23,36	10,39	11,84	12,87	ND	ND	ND
EGF	4,65 <sup>a,c</sup>	3,97 <sup>a,b</sup>	3,53 <sup>a,b</sup>	3,20 <sup>b</sup>	4,95 <sup>a,c</sup>	4,19 <sup>a,b</sup>	5,96 <sup>c,d</sup>	8,29 <sup>d</sup>	9,42 <sup>d</sup>	6,85 <sup>d</sup>

Los valores que no comparten un superíndice común (dentro de cada fila) son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Los rangos intercuartil están recogidos en el estudio de Ruiz et al.<sup>15</sup>. ND: no detectado.

nificativa en función de la cohorte. Curiosamente, G-CSF y EGF mostraron tendencias opuestas (concentraciones más bajas de G-CSF y mayores de EGF) en las muestras de las cohortes ubicadas en países con índices de desarrollo humano muy elevados (España, Suecia y Estados Unidos).

### Análisis multivariable

Las frecuencias de detección de los compuestos inmunes se evaluaron adicionalmente por análisis de agrupamiento y trazado de mapas de calor (*heat maps*). Globalmente, estos análisis sugieren que los perfiles inmunológicos de las muestras de leche de mujeres sanas pueden diferenciarse según el origen geográfico de las donantes de las muestras. La agrupación jerárquica de las frecuencias de detección de los factores inmunitarios mostró 8 grupos diferentes que, en general, mostraron una gran relación con el índice de desarrollo humano de los países donde se obtuvieron las muestras. Así, los grupos I, II y VII incluyeron principalmente muestras de los países con un índice de desarrollo humano muy alto (España, Suecia y Estados Unidos); la mayoría de las muestras de Ghana (con índice de desarrollo humano medio) se incluyeron en el grupo III, que también contenía algunas muestras de países africanos con un índice de desarrollo bajo (Etiopía, Gambia, Kenia). Los clústeres IV y VIII consistieron principalmente en muestras de países con un índice de desarrollo bajo y, finalmente, los grupos V y VI fueron heterogéneos<sup>15</sup>.

El número de factores inmunes con concentraciones por debajo de los límites de detección fue mayor en muestras de lugares más desarrollados (mediana: 11) en comparación con los recolectados en regiones con menor desarrollo (mediana: 7) (prueba de Kruskal-Wallis:  $p < 0,05$ ). Además, 4 de los factores determinados en este estudio (IL-10, IL-5, IL-12 e INF $\gamma$ ) sólo se pudieron detectar en muestras de países con un bajo índice de desarrollo (Etiopía, Gambia y Kenia) y no se detectaron en ninguno de los altamente desarrollados.

Adicionalmente, se estudiaron las relaciones TNF $\alpha$ /IL-10 e IL-10/IL-12, dado que se han asociado con estados proinflamatorios y antiinflamatorios, respectivamente<sup>16</sup>. En general, los

mayores valores de la tasa antiinflamatoria se encontraron en las muestras de países en vías desarrollo y las menores en los altamente desarrollados. ( $p < 0,05$ ). Lo contrario sucedió con la tasa proinflamatoria.

### Discusión

Los resultados de este estudio apoyan firmemente el concepto de que, a pesar de la existencia de una gran variabilidad interindividual e interpoblacional en el perfil de factores inmunitarios presentes en la leche de mujeres sanas, existe un conjunto común de compuestos inmunológicos solubles que se encuentran presentes en la leche madura producida por mujeres sanas, independientemente de su ubicación geográfica. Este hecho sugiere que estos compuestos son especialmente importantes para la salud infantil (y/o mamaria), independientemente de la situación contextual. Por el contrario, la presencia y/o concentración de muchos otros compuestos inmunológicos varían entre poblaciones geográficamente diferenciadas, de forma similar a lo que sucedía con los perfiles de oligosacáridos de la leche humana observados dentro de la misma cohorte<sup>17</sup>. Quizás estas sustancias más «variables» tengan una importancia distinta según la ubicación geográfica, la presión de los patógenos más prevalentes en cada localización, la dieta, la higiene, los factores genéticos, las normas culturales, etc., o puedan reflejar las necesidades cambiantes de los lactantes.

Desde un punto de vista inmunológico, la leche humana contiene una gran cantidad de elementos inmunitarios (células inmunitarias, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, Ig, etc.) que proporcionan protección pasiva al lactante durante un periodo de especial vulnerabilidad<sup>18</sup>. Además, tales elementos contribuyen activamente a la maduración del sistema inmunitario del bebé y al establecimiento de la función de barrera en sus mucosas<sup>19,20</sup>. Globalmente, nuestros resultados indican que los factores inmunitarios de la leche humana muestran una alta inter/intravariabilidad en diferentes poblaciones, tal como se ha observado en estudios previos limitados a un número considera-

blemente menor de factores inmunitarios<sup>21,22</sup>. Entre los factores analizados, únicamente IgA, IgG, IgM, EGF, TGF $\beta$ 2, IL7, IL8, Gro $\alpha$  y MIP1 $\beta$  se encontraron en todas o en la mayoría de las muestras recogidas en cada población en concentraciones variables pero biológicamente relevantes. Por tanto, este conjunto de compuestos podría considerarse como los factores inmunitarios solubles comunes presentes en la leche producida por mujeres sanas, independientemente de su localización geográfica y de sus circunstancias vitales. Cada uno de estos factores tiene un papel clave en el desarrollo de la función de barrera y de las funciones inmunológicas de los lactantes. También podrían ser importantes para proteger a la glándula mamaria frente a procesos patológicos durante la lactancia.

Los anticuerpos maternos adquiridos pasivamente son importantes para la protección frente a algunos patógenos en el periodo neonatal, y promueven la homeostasis intestinal a largo plazo mediante la regulación de la microbiota intestinal y de la expresión génica del hospedador<sup>23</sup>. Entre las Ig, la IgA secretora (IgAs) es la clase predominante en la leche humana, hecho que compensa la deficiencia de IgA del lactante y que contribuye notablemente a la prevención de enfermedades infecciosas respiratorias y gastrointestinales<sup>3</sup>. Tanto la IgA como la IgM de la leche humana son activas frente un amplio espectro de virus, bacterias, protozoos, levaduras y mohos, lo que impide la colonización y la invasión de numerosos patógenos. La exclusión inmunitaria de antígenos se realiza principalmente mediante la IgAs en cooperación con las defensas innatas, pero la IgM secretora también es muy relevante para la salud neonatal, ya que es necesaria para inactivar algunos patógenos gramnegativos<sup>24</sup>. Además, la IgA parece desempeñar un papel relevante en la regulación de la respuesta inmunitaria a los antígenos de la dieta, ya que algunos estudios han descrito una relación inversa entre los niveles de esta Ig en la leche y el desarrollo de alergias<sup>25,26</sup>.

De forma similar a la IgA, la cantidad y repertorio de las IgGs producidas por los propios lactantes son claramente insuficientes para cubrir sus necesidades durante ese periodo de la vida. La transferencia transplacentaria de IgG sólo corrige parcialmente esta deficiencia, ya que su concentración disminuye rápidamente tras el nacimiento. El lactante comienza a producir activamente IgGs al exponerse a antígenos, pero la respuesta no es completa hasta los 4-5 años de edad; este hecho es responsable de que los bebés sean particularmente sensibles a los microorganismos encapsulados, y es uno de los motivos por los que la lactancia materna confiere un elevado nivel de protección frente a las infecciones que se generan en las mucosas.

Las citoquinas, las quimioquinas y los factores de crecimiento son polipéptidos pluripotentes que operan en redes y coordinan el desarrollo y las funciones del sistema inmunitario. En el pasado, el estudio de estos factores en la leche humana ha resultado complicado, debido a su complejidad, a sus concentraciones relativamente bajas y a la falta de procedimientos y reactivos específicos para su cuantificación en este fluido biológico. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado rápida-

mente el número de estos compuestos detectados en la leche humana, ya que existe un interés creciente en sus roles, que parecen ser extraordinariamente relevantes para la salud materno-infantil<sup>27</sup>, y en las complejas interacciones que se establecen no sólo entre ellos, sino también con otros factores inmunológicos y de defensa presentes en la leche y/o el tracto gastrointestinal infantil (lisozima, lactoferrina, HMO, mucinas, lípidos funcionales, péptidos y proteínas antimicrobianas, poliaminas, microorganismos, etc.)<sup>28</sup>.

En concordancia con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en estudios previos se ha demostrado que la presencia de concentraciones variables (pero generalmente altas) de TGF $\beta$ 2 es una característica común de la leche humana en condiciones fisiológicas<sup>29</sup>. El TGF $\beta$  es un factor inmunomodulador clave en la leche humana, ya que resulta crítico para la inducción de la tolerancia oral y la regulación global de las respuestas inmunitarias intestinales tras la ingestión de alimentos<sup>30,31</sup>. Los estudios epidemiológicos han demostrado una correlación positiva entre los niveles de TGF $\beta$  en la leche humana y la protección frente a sibilancias y dermatitis atópica en los niños amamantados<sup>32,33</sup>. Además, el TGF $\beta$ 2 atenúa específicamente las respuestas inflamatorias inducidas por IL-1 $\beta$  en el intestino humano inmaduro a través de un mecanismo dependiente de SMAD6 y ERK<sup>34</sup>.

Las quimioquinas son bien conocidas por su capacidad para atraer leucocitos, hecho que resulta fundamental para dirigir la respuesta inmunitaria a los lugares donde existe una infección o una lesión<sup>35</sup>. Nuestro trabajo sugiere que las quimioquinas Gro $\alpha$  (o CXCL1), IL-8 y, en menor medida, MIP1 $\beta$ , se incluyen en el *core* inmunológico común de la leche humana. Se sabe además que Gro $\alpha$  desempeña un papel en el desarrollo de la médula espinal al inhibir la migración de precursores de oligodendrocitos<sup>36</sup>. Esta quimioquina disminuyó la gravedad de la esclerosis múltiple en un modelo de ratón y puede proporcionar una función neuroprotectora<sup>37</sup>. Además, Gro $\alpha$  participa en algunos procesos que son esenciales en los primeros años de vida, como la angiogénesis y la cicatrización de heridas<sup>38,39</sup>. La IL-8, por su parte, puede ser particularmente relevante para el tráfico de leucocitos desde la circulación materna a la glándula mamaria y hacia la leche<sup>40</sup>.

En relación con los factores de crecimiento, el EGF estuvo presente en todas las muestras analizadas en este estudio. El EGF potencia la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales en el tracto gastrointestinal y favorece la cicatrización de las lesiones que se producen en las mucosas<sup>41,42</sup>. Las principales fuentes de EGF para el tracto gastrointestinal infantil son el calostro y la leche humana. El EGF en la leche humana tiene un efecto protector frente a las enfermedades neonatales que afectan al intestino, como la enterocolitis necrotizante<sup>43</sup>. Esta protección se ha asociado al papel de este factor de crecimiento en la alteración del equilibrio de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas<sup>44</sup>. El EGF también parece contribuir al mayor tamaño del timo de los lactantes amamantados (en comparación con los alimentados con fórmula)<sup>45</sup>. Esto podría conducir a una mejor regulación de la diferenciación y maduración de los linfocitos T

y, en consecuencia, a un menor riesgo de enfermedad autoinmune. Por otra parte, se ha sugerido que los niveles de IL-7 (una citoquina que, según los resultados de este trabajo, forma parte del *core* de factores inmunitarios de este fluido) pueden estar asociados con una mejor función del timo infantil<sup>46</sup>.

A pesar de la variabilidad inter/intracohorte, los perfiles inmunitarios obtenidos en este estudio permitieron dividir las muestras en grupos altamente concordantes con su origen geográfico y/o con el índice de desarrollo humano de los países donde se obtuvieron. Globalmente, los perfiles de las muestras obtenidas en países en vías de desarrollo fueron consistentes con una mayor plasticidad de la respuesta inmunitaria, capaz de ejercer protección frente una amplia gama de estímulos. En las muestras de estos países se observaron valores más elevados en la tasa antiinflamatoria IL-10/IL-12. En el marco de la «hipótesis de la higiene», esto puede reflejar un mayor nivel de exposición materna a microorganismos y otros antígenos. Por el contrario, el perfil de las muestras recogidas en los países desarrollados se caracterizó por la presencia de un menor espectro de factores inmunitarios y por niveles más altos de IgA y EGF. Este hecho es consistente con un predominio de la actividad de las células B en relación con la inmunidad mediada por células T, lo que refleja el impacto de algunas prácticas generalizadas en los países occidentales (higiene puerperal, menor contacto con animales, alimentos microbiológicamente seguros, sistemas de saneamiento del agua y de los efluentes, vacunación, uso de antibióticos, corticoides y otros antiinflamatorios, etc.).

En este contexto, hay que resaltar que las 2 poblaciones de Gambia incluidas en este estudio, con el mismo origen étnico pero que vivían en 2 entornos ambientales diferentes (rural y urbano), presentaron diferencias significativas en algunos factores inmunitarios. En general, la frecuencia de detección y la concentración de TNF $\alpha$  y la frecuencia de detección de algunos factores relacionados con la inmunidad adquirida (IL-17 e IL-5), que se desarrollan durante la vida como resultado de exposiciones antigénicas y, por tanto, estrechamente relacionados con las presiones ambientales, fueron mayores entre las mujeres que vivían en el medio rural.

Como conclusión global, cabe mencionar que la leche humana es un líquido complejo y dinámico que proporciona factores inmunitarios y otros compuestos bioactivos que pueden modular y educar al sistema inmune del lactante. El potencial inmunológico de la leche difiere de una madre a otra, y es probable que dependa de la exposición de la madre a los antígenos y de su respuesta inmunitaria contra ellos, entre otros factores. Una mejor comprensión de los factores que controlan los niveles de estos compuestos en la leche ayudará a establecer nuevas estrategias para prevenir las enfermedades infantiles y ampliará las fronteras actuales de la inmunología.

## Agradecimientos

Este proyecto ha sido posible gracias a la siguiente financiación: National Science Foundation (Estados Unidos; ref.:

1344288), Ministerio de Economía y Competitividad (España, proyecto AGL2016-75476-R) y Comisión Europea (ref.: 624773; FP-7-PEOPLE-2013-IEF). Los *kits* para la recogida de las muestras (estériles, de un solo uso) fueron donados por Medela Inc. (Suiza). Los autores agradecen la contribución imprescindible de numerosos investigadores y clínicos en la solicitud de los permisos, el reclutamiento de las mujeres participantes y la recogida, conservación y envío de las muestras. El consorcio INSPIRE está formado por los siguientes investigadores: Mark A. McGuire, Janet E. Williams, Sarah L. Brooker, William J. Price, Bahman Shafii y James Foster (University of Idaho, Moscow, Estados Unidos), Daniel W. Sellen (University of Toronto, Canadá), Elizabeth W. Kamau-Mbuthia, Egidioh W. Kamundia y Samwel Mbugua (Egerton University, Nakuru, Kenia), Sophie E. Moore (Elsie Widdowson Laboratory, Cambridge, Reino Unido), Andrew M. Prentice (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido), Linda J. Kvist (Lund University, Lund, Suecia), Gloria E. Otoo (University of Ghana, Accra, Ghana), Caitlyn Placek y Kimberly A. Lackey (Washington State University, Pullman, Estados Unidos), Bianca Robertson (University of California, San Diego, Estados Unidos) y Rossina G. Pareja (Nutrition Research Institute, Lima, Perú). ■

## Bibliografía

1. Bourges D, Meurens F, Berri M, Chevaleyre C, Zanella G, Levast B, et al. New insights into the dual recruitment of IgA<sup>+</sup> B cells in the developing mammary gland. *Mol Immunol*. 2008; 45: 3.354-3.362.
2. Dill R, Walker AM. Role of prolactin in promotion of immune cell migration into the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2017; 22: 13-26.
3. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*. 2003; 21: 3.382-3.388.
4. Lodge CJ, Tan DJ, Lau MX, Dai X, Tham R, Lowe AJ, et al. Breast-feeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015; 104: 38-53.
5. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2011; 4: 603-611.
6. Dvorak B. Milk epidermal growth factor and gut protection. *J Pediatr*. 2010; 156 Supl 2: 31-35.
7. Dunstan JA, Roper J, Mitoulas L, Hartmann PE, Simmer K, Prescott SL. The effect of supplementation with fish oil during pregnancy on breast milk immunoglobulin A, soluble CD14, cytokine levels and fatty acid composition. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34: 1.237-1.242.
8. Kondo N, Suda Y, Nakao A, Oh-Oka K, Suzuki K, Ishimaru K, et al. Maternal psychosocial factors determining the concentrations of transforming growth factor-beta in breast milk. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011; 22: 853-861.
9. Groer M, Davis M, Steele K. Associations between human milk SIgA and maternal immune, infectious, endocrine, and stress variables. *J Hum Lact*. 2004; 20(2): 153-158.
10. Holmlund U, Amoudruz P, Johansson MA, Haileselassie Y, Ongoi-ba A, Kayentao K, et al. Maternal country of origin, breast milk characteristics and potential influences on immunity in offspring. *Clin Exp Immunol*. 2010; 162: 500-509.



11. Tomićić S, Johansson G, Voor T, Björkstén B, Böttcher MF, Jenmalm MC. Breast milk cytokine and IgA composition differ in Estonian and Swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy. *Pediatr Res.* 2010; 68: 330-334.
12. Olivares M, Albrecht S, De Palma G, Ferrer MD, Castillejo G, Schols HA, et al. Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur J Nutr.* 2015; 54: 119-128.
13. Munblit D, Treneva M, Peroni DG, Colicino S, Chow LY, Dissanayeke S, et al. Colostrum and mature human milk of women from London, Moscow and Verona: determinants of immune composition. *Nutrients.* 2016; 8: 695.
14. Espinosa-Martos I, Jiménez E, De Andrés J, Rodríguez-Alcalá LM, Tavárez S, Manzano S, et al. Milk and blood biomarkers associated to the clinical efficacy of a probiotic for the treatment of infectious mastitis. *Benef Microbes.* 2016; 7: 305-318.
15. Ruiz L, Espinosa-Martos I, García-Carral C, Manzano S, McGuire MK, Meehan CL, et al. What's normal? Immune profiling of human milk from healthy women living in different geographical and socioeconomic settings. *Front Immunol.* 2017; 8: 696.
16. Tsurumi A, Que YA, Ryan CM, Tompkins RG, Rahme LG. TNF- $\alpha$ /IL-10 ratio correlates with burn severity and may serve as a risk predictor of increased susceptibility to infections. *Front Public Health.* 2016; 4: 216.
17. McGuire MK, Meehan CL, McGuire MA, Williams JE, Foster J, Sellen DW, et al. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *Am J Clin Nutr.* 2017; 105: 1.086-1.100.
18. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60: 49-74.
19. Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Paediatr Adolesc Health Care.* 2007; 37: 7-36.
20. Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr.* 2010; 156 Suppl 2: 8-15.
21. Srivastava MD, Srivastava A, Brouhard B, Saneto R, Groh-Wargo S, Kubit J. Cytokines in human milk. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1996; 93: 263-287.
22. Kverka M, Burianova J, Ladinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Cincova J, Tuckova L, et al. Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clin Chem.* 2007; 53: 955-962.
23. Rogier EW, Frantz AL, Bruno ME, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, et al. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 3.074-3.079.
24. Brandtzaeg P, Johansen FE. IgA and intestinal homeostasis. En: Kaetzel CS, ed. *Mucosal immune defense: immunoglobulin A.* Nueva York: Springer Science, 2007; 221-268.
25. Järvinen KM, Laine ST, Järvenpää AL, Suomalainen HK. Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr Res.* 2000; 48: 457-462.
26. Savilahti E, Siltanen M, Kajosaari M, Vaarala O, Saarinen KM. IgA antibodies, TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2, and soluble CD14 in the colostrum and development of atopy by age 4. *Pediatr Res.* 2005; 58: 1.300-1.305.
27. Garofalo RP. Cytokines in human milk. *J Pediatr.* 2010; 156: 36S-40S.
28. Jakaitis BM, Denning PW. Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clin Perinatol.* 2014; 41: 423-435.
29. Verhasselt V. Neonatal tolerance under breastfeeding influence: the presence of allergen and transforming growth factor- $\beta$  in breast milk protects the progeny from allergic asthma. *J Pediatr.* 2010; 156: 16S-20S.
30. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006; 24: 179-189.
31. Penttilä IA. Milk-derived transforming growth factor- $\beta$  and the infant immune response. *J Pediatr.* 2010; 156: 21S-25S.
32. Kalliomaki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104: 1.251-1.257.
33. Oddy WH, Halonen M, Martínez FD, Lohman IC, Stern DA, Kurzius-Spencer M, et al. TGF- $\beta$  in human milk is associated with wheeze in infancy. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112: 723-728.
34. Rautava S, Nanthakumar NN, Dubert-Ferrandon A, Lu L, Rautava J, Walker WA. Breast milk-transforming growth factor- $\beta$  specifically attenuates IL-1 $\beta$ -induced inflammatory responses in the immature human intestine via an SMAD6- and ERK-dependent mechanism. *Neonatology.* 2011; 99: 192-201.
35. Yung SC, Murphy PM. Antimicrobial chemokines. *Front Immunol.* 2012; 3: 276.
36. Tsai HH, Frost E, To V, Robinson S, French-Constant C, Geertman R, et al. The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell.* 2002; 110: 373-383.
37. Omari KM, Lutz SE, Santambrogio L, Lira SA, Raine CS. Neuroprotection and remyelination after autoimmune demyelination in mice that inducibly overexpress CXCL1. *Am J Pathol.* 2009; 174: 164-176.
38. Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja MN, et al. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2000; 115: 234-244.
39. Vries MH, Wagenaar A, Verbruggen SE, Molin DG, Dijkgraaf I, Hackeng TH, et al. CXCL1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the peri-collateral space. *Angiogenesis.* 2015; 18: 163-171.
40. Böttcher MF, Jenmalm MC, Björkstén B, Garofalo RP. Chemoattractant factors in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatr Res.* 2000; 47: 592-597.
41. Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci.* 1999; 4: 303D-309D.
42. Warner BW, Warner BB. Role of epidermal growth factor in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2005; 14: 175-180.
43. Sullivan PB, Brueton MJ, Tabara ZB, Goodlad RA, Lee CY, Wright NA. Epidermal growth factor in necrotising enteritis. *Lancet.* 1991; 338: 53-54.
44. Clark JA, Lane RH, MacLennan NK, Holubec H, Dvorakova K, Halpern MD, et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 288: 755G-762G.
45. Hasselbalch H, Engelmann MD, Ersboll AK, Jeppesen DL, Fleischer-Michaelsen K. Breast-feeding influences thymic size in late infancy. *Eur J Pediatr.* 1996; 158: 964-967.
46. Ngom PT, Collinson AC, Pido-López J, Henson SM, Prentice AM, Aspinall R. Improved thymic function in exclusively breastfed infants is associated with higher interleukin 7 concentrations in their mothers' breast milk. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 722-728.