



Hallazgos recientes sobre proteínas nutritivas y bioactivas en la leche materna apoyan las recomendaciones de la OMS de que la lactancia materna debe continuar durante el primer año y más allá

Reimpreso con el permiso de: *Ann Nutr Metab* 2016; 69 (suppl 2): 17-26

Proteínas nutricionales y bioactivas en la leche materna

Por Ferdinand Haschke et al.

Puntos clave

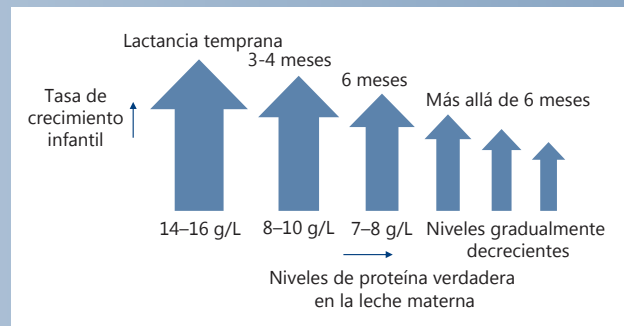
La ingesta proteica de lactantes a término con lactancia materna se ha utilizado como base para estimar las necesidades de proteínas de un bebé durante el primer año. La ganancia diaria de proteína es más alta en el lactante muy joven y disminuye rápidamente en la infancia tardía y en el segundo año de vida. El contenido de proteínas de la leche materna evoluciona dependiendo de la etapa de lactancia y del tiempo transcurrido desde el parto. De hecho, la concentración de proteínas en la leche materna es alta durante las primeras semanas de lactancia y disminuye gradualmente durante el primer año. La cantidad y calidad de la leche materna es fundamental para apoyar el crecimiento del lactante y el desarrollo a largo plazo.

Conocimiento actual

Las proteínas son los terceros sólidos más abundantes encontrados en la leche materna. La variedad de funciones que desempeñan las proteínas y péptidos bioactivos en la leche materna arroja luz sobre por qué los lactantes amamantados tienen menor morbilidad y menos infecciones. La lactoferrina, la IgA secretora, la osteopontina y diversas citocinas modulan el sistema inmune del lactante junto con la lisozima, la κ -caseína y la lactoperoxidasa, que tienen funciones antibacterianas. Otras proteínas regulan el desarrollo intestinal y ayudan en la absorción de nutrientes clave.

Implicaciones prácticas

Con base en nuestra mejor comprensión de la evolución de la proteína en la leche materna a lo largo de las etapas de la lactancia, se han desarrollado, probado y puesto a disposición en muchos países nuevas fórmulas infantiles con menor concentración pero con mejor calidad de proteínas.



La concentración de proteína de la leche materna evoluciona con el crecimiento del bebé.

Los recién nacidos de bajo peso al nacer tienen mayores requerimientos de proteínas que los recién nacidos a término debido a su mayor ganancia diaria de proteína por unidad de peso corporal. Las concentraciones de proteína y aminoácidos en la leche materna de las madres que tuvieron partos prematuros son mayores durante las primeras semanas de lactancia comparadas con las de las madres que tienen partos a término. La suplementación de la leche materna es necesaria para satisfacer los altos requerimientos de proteínas de los lactantes con muy bajo y extremadamente bajo peso al nacer.

Lectura recomendada

Lønnerdal B, Erdmann P, Thakkar SK, Sauser J, Destaillassat F: Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *J Nutr Biochem* 2016;41:1-11.

Proteínas nutritivas y bioactivas en la leche materna

Ferdinand Haschke^a Nadja Haiden^b Sagar K. Thakkar^c

^a Departamento de Pediatría, Paracelsus Medical University, Salzburg, y ^b Departamento de Pediatría, Medical University Vienna, Viena, Austria; ^c Nestlé Research Center, Lausana, Suiza

Mensajes clave

- Se utilizó la ingesta de proteínas de los lactantes de término alimentados al seno materno, como modelo para calcular los requerimientos de proteína durante el primer año de vida. Son más altos durante los primeros meses, cuando el aumento diario de peso es rápido y menores durante la infancia tardía, cuando el aumento diario de peso se hace más lento.
- La leche materna contiene una multitud de proteínas bioactivas en altas concentraciones durante el inicio de la lactancia y disminuyen conforme progresa la lactancia.
- La cantidad y calidad de la proteína en la leche materna son cruciales para el crecimiento sano y el desarrollo a largo plazo.

Palabras clave

Requerimientos de proteínas para el crecimiento · Proteínas nutritivas · Proteínas bioactivas · Péptidos bioactivos · Lactantes · Leche materna · Lactoferrina · Inmunoglobulinas

Resumen

La proteína ingerida con la leche materna proporciona aminoácidos esenciales que son necesarios para la síntesis de proteína nueva para el crecimiento y reemplazo de las pérdidas en orina, heces y piel. La ganancia de proteína en el cuerpo de un lactante es la más alta durante los prime-

ros meses de vida, cuando las concentraciones de proteína en la leche materna son más altas que durante las etapas tardías de la lactancia. Los lactantes con bajo peso al nacer tienen necesidades más altas de proteínas que los lactantes de término y necesitan complementos de proteína durante la alimentación con leche materna. Con base en nuestra mejor comprensión de la evolución de la proteína en la leche materna durante las etapas de la lactancia, se han creado nuevas fórmulas infantiles con menor concentración de proteína, pero de mejor calidad, se probaron con éxito y ahora están disponibles en muchos países. Aparte de proporcionar los aminoácidos indispensables, la proteína bioactiva de la leche materna se clasifica en cuatro funciones principales, es decir, proporcionar protección de las agresiones microbianas y protección inmunitaria, ayudar a las funciones digestivas, desarrollo intestinal y ser transportadoras para otros nutrientes. Las proteínas individuales y sus bioactividades propuestas se resumen en este artículo. En efecto, ciertas proteínas como la lactoferrina y la sIgA se han estudiado ampliamente por sus funciones biológicas, mientras que otras tal vez requieran de más datos de apoyo para validar sus funciones propuestas.

© 2017 Nestec Ltd., Vevey/ S. Karger AG, Basilea

Introducción

La alimentación al seno materno es importante para el crecimiento y desarrollo saludable de los lactantes y niños pequeños. La OMS recomienda alimentación al seno materno exclusiva hasta los 6 meses y continuarla hasta los 2 años como parte de una dieta mixta. Sin embargo, encuestas recientes

Cuadro 1. Funciones bioactivas de las proteínas de la leche materna

Función	Bioactividad	Referencias
Inmunomodulación y actividad antimicrobiana	Lactoferrina	29, 30, 113
	IgA Secretora	36, 114
	Osteopontina	38, 43
	Citocinas	53, 54
	Lisozima	57
	κ -Caseína	59
	Lactoperoxidasa	61, 62
	Haptocorrina	64
	α -Lactalbúmina	70
Función digestiva	Lipasa estimulada por sales biliares	79
	Amilasa	81
	α 1-antitripsina	86
Desarrollo intestinal	Factores de crecimiento	91
	Lactoferrina	94
Transportadores de otros nutrientes	Lactoferrina	96
	Haptocorrina	99
	Proteína fijadora de folato	105, 106
	α -Lactoalbúmina	107
	β -Caseína	111, 112

DHS indican que aún en los países en desarrollo, sólo 32% de las madres alimentan al seno materno de manera exclusiva a sus bebés hasta los 6 meses [1], y la calidad de los alimentos complementarios es muy baja. Por lo tanto, en muchos países en desarrollo, el retraso del crecimiento sigue siendo prevalente en cerca de 20% de los niños menores de 5 años de edad [2]. En la mayoría de los países industrializados, se introducen los sólidos entre los 4 y 6 meses de edad y la lactancia se suspende a menudo mucho antes de lo recomendado.

Después de los hidratos de carbono y lípidos, las proteínas son los sólidos más abundantes en la leche materna (LM), que no sólo proporcionan los aminoácidos indispensables para el crecimiento sino también las proteínas bioactivas y péptidos esenciales para muchas funciones (Cuadro 1).

Requerimientos de proteína para el crecimiento

La ingesta de proteína de los lactantes de término alimentados al seno materno se ha utilizado como un modelo para calcular los requerimientos durante el primer año [3,4]. El contenido de proteína en la LM se cuantifica mediante la evaluación directa del contenido verdadero de proteína [5]. Se ha informado de concentraciones verdaderas de proteína de 14 a 16, 8 a 10 y 7 a 8 g/L durante la lactancia temprana, a los 3 a 4 meses y a los 6 meses, respectivamente. En un meta-análisis reciente, de 43 estudios [5] se confirma que la concentración de proteína en la LM depende de la etapa de lactancia y el tiempo desde el parto. Indica también una gran variedad en la concentración de proteína, en particular durante los

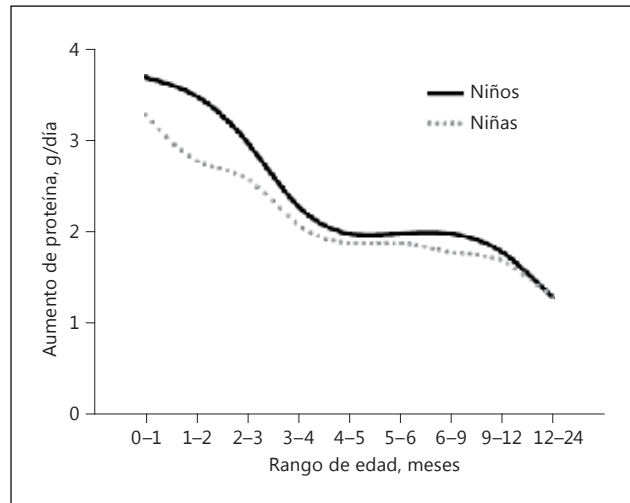


Figura 1. Aumento de proteínas diarias de los niños y niñas de 0 a 24 meses de edad. El aumento se basó en las mediciones de potasio corporal total [7].

primeros meses de lactancia. Sin embargo, la verdadera ingesta de proteína no refleja de manera precisa la cantidad de aminoácidos utilizables para sintetizar nueva proteína corporal porque algunas proteínas de la LM (bioactivas) pueden encontrarse intactas en las heces del lactante [6].

Los requerimientos de proteína para el crecimiento y el recambio diario dependen fuertemente en las tasas de aumento de proteína corporal. La retención diaria de proteína en el cuerpo se calcula mediante la medición de absorción y excreción. Fomon y colaboradores [7] publicaron cálculos detallados de aumento de proteína en niños durante los primeros 2 años de vida y más allá. Con base en el agua corporal total (calculando el compartimento intracelular y el extracelular), el potasio corporal total (calculando el compartimento intracelular en donde casi toda la proteína está presente), y el calcio corporal total (minerales óseos), se calcularon todos los componentes de la masa magra. Debido a que el potasio es el principal catión intracelular, los aumentos en diferentes rangos de edad permiten calcular el aumento de proteína corporal total (Figura 1). El aumento diario de proteína es más alto en el lactante pequeño y disminuye con rapidez durante la infancia tardía y el segundo año de vida: durante los primeros meses, el aumento de proteína es tres veces mayor que entre los 12 y 24 meses. En efecto, la concentración de proteína en la LM es alta durante las primeras semanas y después continúa disminuyendo durante el primer año, pero en velocidades sustancialmente menores que las observadas en las primeras semanas (Figura 2). La caseína y la mayor parte de las proteínas del suero de leche en la LM se utilizan en el crecimiento. Sus concentraciones cambian profundamente a lo largo de la lactancia: durante las primeras 2 semanas de

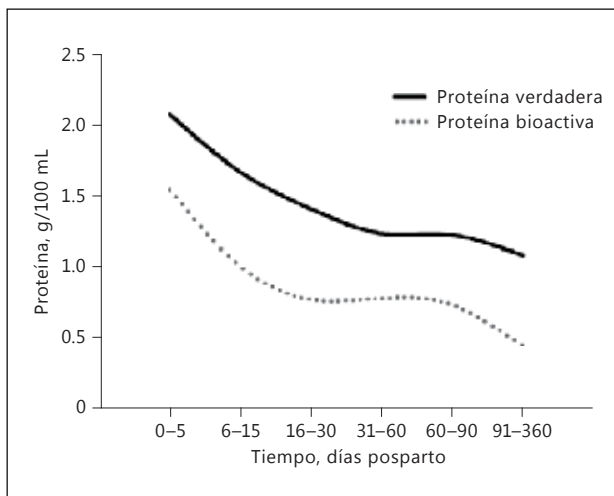


Figura 2. La evolución de la proteína verdadera (línea gruesa) y la proteína bioactiva (línea punteada; suma de lactoferrina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica, sIgA, IgG, IgM, lisozima, proteínas bioactivas bien catalogadas) de la leche materna dentro del primer año de vida posparto. Basado en datos de Lönnnerdal y colaboradores [5].

lactancia, las concentraciones de las proteínas del suero de leche son muy altas, mientras que las concentraciones de caseína son bajas, lo cual da como resultado una proporción suero:caseína hasta de 80:20. La proporción cae hasta 65:35 para la segunda semana y permanece constante en alrededor de 60:40 de ahí en adelante [5].

Las proteínas son cadenas poliméricas hechas de aminoácidos unidos por uniones peptídicas. Durante el proceso de digestión, la mayoría de las proteínas se descompone a aminoácidos simples o pequeños péptidos que se absorben. Los aminoácidos que se absorben y no se oxidan son los ladrillos de la nueva proteína la cual se sintetiza en el cuerpo. A pesar de la reducción en la proteína a lo largo del tiempo, el valor nutritivo de la proteína de la LM, medida mediante el cociente de aminoácidos esenciales totales a aminoácidos totales, parece ser constante a lo largo del tiempo. Estos cambios se correlacionan bien con las necesidades en evolución del lactante en crecimiento [8].

Debido a su mayor aumento diario de proteína por unidad de peso corporal, los bebés con bajo peso al nacer tienen requerimientos mayores de proteínas que los de término [9, 10]. Las concentraciones de proteína y aminoácidos durante las primeras semanas de lactancia son mayores en la LM de madres que tienen partos prematuros que en la LM de madres que dan a luz al término [8]. Sin embargo, alimentar con LM sin complementos no satisface los requerimientos de proteína, en particular en los lactantes de muy bajo peso y peso extremadamente bajo. Los suplementos que están en el mercado están constituidos con base en fracciones de

proteína de leche de vaca o de leche materna de donadora. La suplementación de la LM o el uso de fórmulas para prematuros mejora las tasas de crecimiento de los lactantes de bajo peso al nacer, aunque no se sabe con seguridad si ya se encontró la mezcla correcta de aminoácidos indispensables para la síntesis de proteína corporal nueva, en los lactantes con bajo peso al nacer.

Desde hace más de dos décadas se han mostrado las diferencias en el crecimiento entre los lactantes alimentados al seno materno y los lactantes alimentados con fórmulas de alto contenido proteínico (es decir, > 2.25 g/100 kcal) [11]. Los lactantes alimentados con fórmula de alto contenido proteínico crecen más rápido durante los primeros 2 años y más allá [12], y tienen concentraciones sanguíneas más altas de insulina y del factor 1 de crecimiento semejante a la insulina [13, 14]. El crecimiento rápido durante el primer año se relaciona con obesidad durante la niñez. Tres estudios longitudinales confirmaron una relación fuerte entre el aumento de peso entre los 0 y 12 meses y el índice de masa corporal (IMC) a los 12, 36 y 60 meses (Figura 3)[10]: 21% de la varianza del IMC a los 60 meses se explica por el aumento de peso entre el nacimiento y los 12 meses. Para reducir la brecha proteínica entre la LM y la fórmula infantil se requiere una profunda comprensión de la forma en que cambia la calidad y cantidad de la LM a lo largo del tiempo. La composición de las fórmulas infantiles ha evolucionado con el creciente conocimiento de la LM. En fechas recientes se publicó un análisis agrupado de datos individuales de crecimiento (11 estudios clínicos; $n = 1\ 882$) [15] de lactantes que recibieron una fórmula inicial modificada a base de suero de leche, con bajo contenido proteínico (1.8 g proteína/100 kcal) [16] con un perfil de aminoácidos cercano a la LM [17] de término. El peso y estatura de los lactantes alimentados con la fórmula a los 4 meses corresponde al percentil 50 del estándar de crecimiento global de la OMS [18]. El estudio CHOP en Europa siguió el crecimiento de los niños que habían sido alimentados con fórmulas de bajo y alto contenido de proteínas durante el primer año de vida. A los 6 años, el IMC y el porcentaje de niños con obesidad fue significativamente menor en el grupo de fórmula de bajo contenido de proteínas [12]. En dos ensayos controlados aleatorizados [19, 20] se pusieron a prueba dos fórmulas de seguimiento con bajo contenido proteínico (1.6 g de proteína/100 kcal) y se dio seguimiento a los niños hasta los 5 años de edad. El IMC a los 5 años, de los niños alimentados con la proteína de bajo contenido proteínico fue similar al de los niños alimentados exclusivamente al seno materno hasta los 4 a 6 meses [10].

Por lo tanto, parece que la cantidad y calidad de la proteína de la LM son cruciales para el crecimiento saludable y el desarrollo a largo plazo. Es posible que algunas proteínas nutritivas que se absorben bien o en parte, tengan también funciones biológicas. Además, existen proteínas bioactivas en la LM que no se absorben. Funciones específicas de pro-

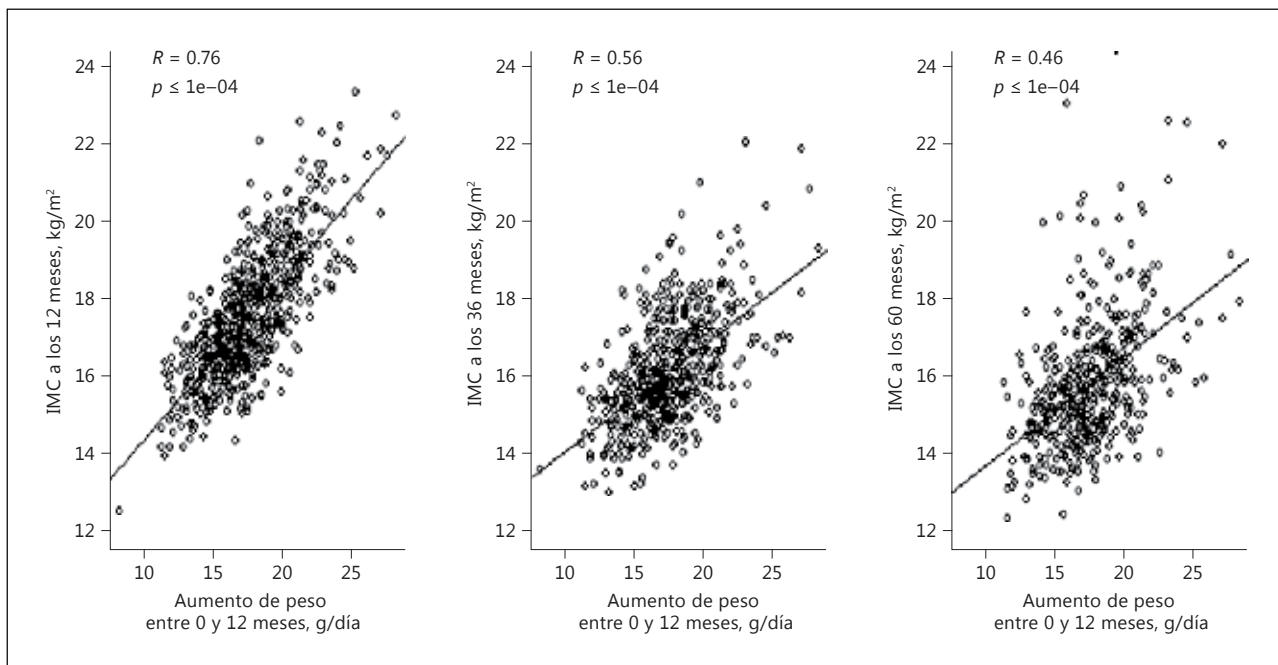


Figura 3. El aumento de peso entre el nacimiento y los 12 meses pronostica el IMC a los 12, 36 y 60 meses. Datos provenientes de tres estudios longitudinales (Italia, EUA, Chile).[10]

teínas bioactivas y péptidos que se han estudiado en detalle proporcionan conocimiento sobre las razones por las que los lactantes alimentados al seno materno tienen una morbilidad menor y periodos de infección más cortos [21], así como diferente microbiota [22].

Proteínas bioactivas (funcionales) en la LM

Actividad inmunomoduladora y antimicrobiana

Lactoferrina

La lactoferrina, también conocida como lactotransferrina, se informó que estaba presente en la leche de bovino a finales de la década de 1930, y se cuantificó en la LM a principios de la década de 1960 [23]. Se describió originalmente como “la proteína roja de la leche (de bovino)”, resultó ser una glucoproteína globular multifuncional [24, 25]. El contenido de lactoferrina en la LM disminuye con la progresión de las etapas de la lactancia, se encuentra en mayor cantidad en el calostro con 5.5 g/L y entre 1.5 y 3.0 g/L en la leche madura, dependiendo de la etapa de la lactancia [26]. Se acepta, por lo general, que la lactoferrina resiste la digestión, hasta cierto grado, y por lo tanto es posible encontrarla intacta en las heces del lactante. Sin embargo, al principio de la vida, es posible que una fracción de esta proteína la capte la mucosa intestinal y el resto se digiera para producir péptidos bioactivos [27]. Debido a esta alta afinidad por el hierro férrico, no sólo actúa como transportador de hierro en la LM, sino que también a algunos microbios nocivos los priva del hierro

que es clave para su crecimiento. Además, debido a su dominio N-terminal básico que interactúa con diversos blancos microbianos y del huésped, la lactoferrina no sólo tiene propiedades antimicrobianas, sino que también modula las respuestas inmunitarias innatas y las de adaptación. Esto lo orquestan las citocinas interleucina (IL)-4, IL-2, IL-12 y el interferón- γ y da como resultado su capacidad de actuar como agente antiinflamatorio o proinflamatorio. Se ha demostrado que la lactoferrina compite con lipopolisacáridos para unirse con CD14 y con ello evitar la serie de eventos proinflamatorios mediados por los lipopolisacáridos [28]. Aunque esta molécula es resistente a la digestión y en ocasiones se encuentra intacta en la materia fecal, se digiere en cierto grado para formar lactoferricina, una molécula que es capaz de inhibir la fijación de *Escherichia coli* a las células intestinales [29, 30]. La lactoferricina no es la única lactoferrina relacionada con péptido que tiene actividad antimicrobiana, el papel de Lf(1-11) y la lactoferrampina ha surgido también en fechas recientes [31]. En un estudio se demostró que Lf(1-11) es activa contra bacterias grampositivas (*Staphylococcus* spp. y *Streptococcus mitis*) así como bacterias gramnegativas (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. y *E. coli*) [32].

Inmunoglobulina secretora A

La leche materna es rica en inmunoglobulina secretora A (sIgA, *secretory immunoglobulin A*) en especial durante las primeras etapas de la lactancia. El calostro muestra una

amplia variabilidad de una madre a otra y llega a contener en promedio 2.0 g/L de sIgA, el cual se reduce aproximadamente a 0.5 g/L en la leche madura. [33] El destino de absorción de esta proteína es similar al de la lactoferrina en que es, en parte, excretada intacta y parte es digerida para péptidos bioactivos [27]. Se ha documentado que esta clase de anticuerpo es abundante en la mucosa intestinal de los humanos y otros mamíferos y que protege el epitelio de las agresiones tóxicas. Como primera línea de defensa, en la inhibición de infecciones incidentes, sIgA bloquearía la toxina que se adhiere al epitelio intestinal. En los modelos murinos expuestos a la toxina de *Vibrio cholerae*, sIgA demostró un efecto protector [34]. Otro mecanismo por medio del cual la sIgA bloquearía patógenos es mediante el reconocimiento directo de los dominios de fijación al receptor como el reovirus tipo 1 Lang. Cuando los ratones *knockout* IgA fueron sometidos a prueba de provocación con reovirus, el alimento administrado mediante sonda del grupo IgA de los ratones *knockout* fue tan efectivo como los ratones naturales en cuanto a la eliminación de la infección [35]. La sIgA tal vez tenga también un efecto directo sobre la virulencia de la bacteria. Por ejemplo, la *Shigella flexneri* que se fija a la IgA monoclonal murina suprimió la actividad de la secreción bacteriana tipo 3 (T3S), que es necesaria para que *S. flexneri* tenga acceso al epitelio intestinal [36]. La exclusión inmunitaria a menudo se denomina capacidad de la sIgA de prevenir el acceso del patógeno al epitelio intestinal a través de una serie de procesos que comprenden aglutinación, atrapamiento en moco y eliminación a través de movimientos peristálticos [37].

Osteopontina

La osteopontina es una proteína ácida fosforilada y altamente glucosilada con posibles papeles en la activación inmunitaria, inhibición de la calcificación ectópica, adhesión y migración celular, angiogénesis y remodelación ósea [38]. Con una alta variabilidad entre poblaciones y etapas de la lactancia, la concentración promedio de osteopontina en la LM es aproximadamente de 140 mg/L [39]. Cuando se compara con ratones lactantes naturales, los ratones *knockout* lactantes de osteopontina sufrieron periodos prolongados de brotes intensos de diarrea cuando se expusieron a rotavirus [40]. Se requiere de un equilibrio fino entre la célula T 1 auxiliar (Th 1, *T helper 1*) y la T auxiliar 2 (Th 2) para aliviar una respuesta inmunitaria. Se ha demostrado que la osteopontina induce la expresión de Th 1 e inhibe la Th 2 junto con IL-10 [38]. Es interesante que los lactantes alimentados al seno materno mostraron inducción de la respuesta Th 1 cuando se inmunizaron contra sarampión, paperas y rubéola, mas no fue así en los alimentados con fórmula [41]. Esta observación puede presumiblemente estar ligada a la presencia de osteopontina en LM del grupo alimentado con leche

materna, pero no del grupo alimentado con fórmula. Además, a través de interacciones electrostáticas, la osteopontina forma complejos con la lactoferrina y de esta forma actúa como transportadora de otras proteínas inmunomoduladoras para aumentar la competencia inmunitaria de sus consumidores [42]. En fechas recientes, se llevó a cabo un ensayo controlado aleatorizado en donde se reclutaron dos grupos de lactantes alimentados con fórmula y un grupo alimentado al seno materno. A los dos grupos alimentados con fórmula se les dio una fórmula estándar con 65 mg/L de osteopontina derivada de bovino o una fórmula experimental que contenía 130 mg/L de osteopontina derivada de bovino. Aparte de los parámetros de crecimiento comparables, se observaron diferencias en menores concentraciones de la citocina proinflamatoria, TNF- α , y un número significativamente menor de días cuando los lactantes tuvieron fiebre [43].

Citocinas

El efecto de las citocinas para regular los procesos inflamatorios relacionados a menudo con infección suele ser como una orquesta, que operan en redes y producen efectos en cascada. Se postula que las citocinas aumentan la proliferación de los timocitos, inhiben la producción de IL-2 de las células T y suprimen la producción de IgE [44-46]. A lo largo de los años se ha demostrado la presencia de varias citocinas en la LM. Estas moléculas incluyen, mas no se limitan a, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , interferón- γ , factor de crecimiento transformante β y factor estimulante de colonias. [47-52] Por lo general están presentes en concentraciones muy bajas (picogramos) y es posible que se originen a partir de las células glandulares mamarias epiteliales, o de macrófagos activados y otras células en la LM [53]. La función biológica de estos agentes, en los lactantes, es complementar su fuente propia de citocinas, que se producen en menores cantidades debido a la inmadurez del sistema inmunitario. Aunque las citocinas no están bien estudiadas como otros agentes inmunomoduladores que se describen en esta sección, se postula que estas moléculas equilibran las Th1 y Th2 para impartir beneficios relacionados con la inmunidad [54].

Lisozima

La lisozima pertenece a la fracción de proteína de la clase del suero de la leche en la LM y posee propiedades bactericidas al afectar la pared celular de la mayoría de las bacterias grampositivas y algunas gramnegativas. Se han observado cantidades mayores de lisozima en el calostro, con aproximadamente 0.36 g/L que se reduce un poco en la leche madura hasta 0.30 g/L. [55] Se ha intentado producir lisozima humana recombinante y lactoferrina en ganado productor de leche [56]. Aún no está del todo claro el mecanismo, pero la lisozima que se origina en la LM contiene también actividad en contra del VIH tipo 1 [57].

κ -Caseína

La κ -Caseína pertenece a la familia de fosforoproteínas que participan en varios procesos fisiológicos. Con una concentración promedio de aproximadamente 1.25 g/L en el calostro y leche de transición, se estabiliza cerca de 1 g/L en la leche madura [58]. Estas κ -Caseína glucosiladas de origen humano, a diferencia de las de origen bovino, inhiben la adhesión específica del linaje celular de *Helicobacter pylori* a las células mucosas de la superficie de gástrica humana [59].

Lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa, miembro de la familia de peroxidasa heme, se secreta por las glándulas mamarias y está presente de manera persistente durante la lactancia. En la leche materna, la lactoperoxidasa se encuentra en 1 a 15 unidades/mL durante los primeros 6 meses de la lactancia [60]. Está bien aceptado que esta peroxidasa cataliza la oxidación del tiocianato, proveniente de la saliva de los lactantes, a hipotiocianato, en presencia de pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno que ya está en la boca del bebé. El hipotiocianato que se forma es tal vez el responsable de exterminar las bacterias grampositivas y gramnegativas [61,62].

Haptocorrina

La haptocorrina es una proteína fijadora de vitamina B₁₂ que se encuentra en muchos líquidos corporales que incluyen la LM con un rango de concentración de cerca de 5 mcg/mL en el calostro, hasta 3 mcg/mL en la leche madura [63]. Estructuralmente, la haptocorrina no mostró mucha alteración después de exponerla a enzimas digestivas y fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* en un sistema *in vitro* [64]. En un estudio sistemático posterior, de exposición de la haptocorrina a 34 bacterias comensales y patógenas, se indicó supresión sólo de la *Bifidobacterium breve*, con lo que se implicó su papel que es posible que esté limitado a ciertas cepas y tal vez no sea relevante una etiqueta de frazada antimicrobiana para esta proteína en la que se justifican más estudios [65].

α -Lactoalbúmina

Una proteína bien caracterizada y primaria en la LM, la α -lactoalbúmina está constituida por 123 aminoácidos y 4 puentes disulfuro y constituye 20 a 25% de las proteínas totales de la LM [66, 67]. En vista de que es también una fuente rica de muchos aminoácidos indispensables, una fracción de la proteína se digiere bien y el resto provee de polipéptidos que ejercen actividades antimicrobianas sobre todo contra bacterias grampositivas y no las gramnegativas

[68, 69]. Además, se encontró que una variante plegable de la α -lactoalbúmina es bactericida contra una cepa resistente a antibióticos de *Streptococcus pneumonia* [70]. No sólo por sus beneficios antibacterianos, sino también para imitar de manera más cercana a la LM para obtener beneficios adicionales, se hacen grandes esfuerzos por enriquecer LM sustituta con α -lactoalbúmina [71].

Funciones digestivas

Lipasa estimulada por las sales biliares

La principal fuente de energía para los lactantes alimentados al seno materno es el lípido predominante en la LM, los triacilglicérols. Los triacilglicérols de la leche se digieren mediante acciones complementarias de la lipasa gástrica, la lipasa pancreática dependiente de la colipasa y la lipasa estimulada por las sales biliares (BSSL, *bile salt-stimulated lipase*). Aunque existen dos fuentes de estas enzimas, el páncreas exocrino del lactante, la principal fuente es la BSSL de la leche materna. A principios de la década de 1950, Freudenberg demostró por primera vez que la leche materna

contiene una lipasa inactiva que se estimula cuando el quimo llega al duodeno y se pone en contacto con las sales biliares [72, 73]. A principio de la década de 1980 se purificó y caracterizó la BSSL [74], se demostró que tiene una especificidad de sustrato amplia [75-77] y que se desactiva mediante la pasteurización de la

LM [78]. Por lo tanto, la digestión y absorción de lípidos es mucho menor cuando se alimenta con leche pasteurizada de donadora a los lactantes prematuros [79]. En un estudio reciente, de fase 3, con asignación aleatoria, se agregó BSSL humana recombinante a la fórmula infantil para evaluar si tenía algún impacto sobre la velocidad de crecimiento, que se presume se debe a una mejor digestión y absorción de lípidos. Es interesante que no se observaron beneficios sobre el crecimiento en los lactantes prematuros adecuados para la edad gestacional, pero que sí se presentaron en los lactantes prematuros pequeños para la edad gestacional [80].

Amilasa

En ausencia de amilasa pancreática, la amilasa de la LM cataliza la hidrólisis del almidón, glucógeno y otros sacáridos relacionados mediante la escisión de las uniones α -1,4 para producir maltosa, dextrinas y glucosa. La actividad de la amilasa varía desde 1 000 hasta 5 000 unidades por litro de LM [81]. Se sabe que el calostro contiene actividad mayor en comparación con la leche de transición y la madura

No sólo por sus beneficios antibacterianos, sino también para imitar de manera más cercana a la LM para obtener beneficios adicionales, se hacen grandes esfuerzos por enriquecer LM sustituta con α -lactoalbúmina.

[82]. Existe una disminución adicional de aproximadamente 35% de la actividad después del primer trimestre de lactancia [83]. Además, con una mayor paridad se reduce también la actividad de la amilasa a la mitad [83]. La leche prematura contiene cantidades iguales de actividad de amilasa que la leche de término [84]. Aparte de su papel obvio en ayudar a la digestión, la amilasa actúa también como antibacteriano al atacar los polisacáridos de la pared celular bacteriana [82].

α 1- antitripsina

No se comprende del todo el papel fisiológico de los inhibidores de la proteasa como la α 1- antitripsina (A1AT) en la LM. Sin embargo, como se acepta en general para otros mamíferos, los inhibidores de la proteasa desempeñan un papel en la digestión y/o absorción de las proteínas bioactivas presentes en concentraciones relativamente mayores en el calostro. En efecto, McGilligan y colaboradores [85] mostraron la más alta presencia de A1AT en el calostro (1.4 a 5.2 g/L) en comparación con las primeras 26 semanas (0.07 g/L) o de las 26 a las 52 semanas de lactancia (0.05 g/L). La A1AT resiste la digestión en el tubo digestivo y se encuentra intacta en las heces de lactantes en cantidades significativas [86]. Se han realizado esfuerzos para expresar A1AT humana en corderos transgénicos para posibles aplicaciones en humanos [87, 88].

Desarrollo intestinal

Factores de crecimiento

En la literatura se han descrito los factores de crecimiento, sus concentraciones en la LM y fuentes biológicas [89]. Es posible que se originen a partir de las células epiteliales o del estroma así como de los macrófagos de las glándulas mamarias, los factores de crecimiento están presentes en cantidades de microgramos por litro en la LM. Los factores de crecimiento que están presentes en la luz intestinal, como el factor de crecimiento epidérmico y los factores de crecimiento semejantes a insulina 1 y 2, se originan ya sea de las glándulas salivales de los lactantes o de la leche de las madres [90]. Aún no está del todo clara la forma en que son capaces de ejercer sus efectos sobre sus receptores, que se localizan en la cara basolateral de las células epiteliales intestinales de absorción. En efecto, se ha sugerido que el intestino inmaduro del lactante proporciona acceso a los ligandos hacia el compartimento basolateral. Los lactantes prematuros, cuyo intestino está relativamente subdesarrollado, en comparación con el de los lactantes de término, tal vez tenga concentraciones mucho mayores del factor de crecimiento epidérmico en la leche secretada por sus madres [91].

Lactoferrina

La exposición de la lactoferrina a los modelos de cultivo de células intestinales muestra aumento de proliferación y diferenciación de una manera dependiente de la dosis [92].

Además, tiene también una mayor proliferación de las células de las criptas intestinales en un modelo de lechón [93]. En efecto, es lógico que la maduración rápida de los epitelios intestinales de absorción, en presencia de lactoferrina, contribuya a un mayor aumento de peso en los lactantes alimentados con sustituto de LM con lactoferrina, en comparación con un grupo control sin lactoferrina [94].

Transportadores de otros nutrientes

Lactoferrina

La absorción de hierro en el lactante alimentado al seno materno es más efectiva que con la fórmula infantil a base de leche de vaca [95]. Ciertamente, esto más tarde se atribuyó a la presencia de concentraciones relativamente altas de lactoferrina en la LM, en comparación con la leche de bovino (aproximadamente 1 mg/mL y 10 mcg/mL, respectivamente) y la mayor parte del hierro en la leche se fija a la lactoferrina [25, 26]. Así mismo, más tarde se identificó un receptor de lactoferrina, el cual tenía una mayor afinidad por la lactoferrina humana para la absorción de hierro en comparación con la lactoferrina bovina [96]. En la actualidad se intenta expresar lactoferrina humana recombinante en el arroz, y una comparación de la estabilidad y actividad biológica ha mostrado resultados promisorios para su posible uso en los sustitutos de la LM [97].

Haptocorrina

La haptocorrina, también conocida como transcobalamina 1, tal vez un nombre derivado de "transportador de cobalamina", un nombre alternativo para la vitamina B₁₂, es una proteína de fijación que se encuentra en la LM [98]. En los adultos, la absorción de la B₁₂ depende de los jugos digestivos, enzimas, proteínas fijadoras secretadas en el estómago, factores intrínsecos y sus receptores en el intestino delgado [99]. Sin embargo, en los lactantes se han encontrado cantidades muy bajas de factores intrínsecos en la materia fecal, lo que tal vez indique que la haptocorrina desempeñe un papel mayor en el transporte de la vitamina B₁₂ [100].

Proteína fijadora de folato

Identificada a finales de la década de 1960, la proteína fijadora de folato (FBP, *folate-binding protein*) se fija casi por completo a todo el folato natural de la LM, así como el de la leche de vaca [101, 102]. Desde su descubrimiento se pensó que la FBP secuestra diversas formas de folato y asegura el suministro adecuado para el recién nacido al prevenir también la oxidación en el tubo digestivo [103, 104]. Los sólidos conjuntados de la leche materna y la de bovino contienen alrededor de 2 000 nmol/kg, mientras que la leche de cabra contiene el doble y el secado mediante congelación o secado mediante aspersion de la leche a polvo retiene prácticamente toda la FBP [105, 106]. En vista de que la FBP es capaz de

soportar la digestión, es lógico que el revestimiento intestinal permeable del intestino del lactante sea capaz de captar el complejo folato-FBP por lo menos durante semanas o incluso meses después del parto hasta que se forman las uniones intercelulares herméticas [54].

α - lactoalbúmina

En un principio se propuso que transportaba cationes divalentes como calcio y zinc [54], después mostró absorción mayor en los monos rhesus lactantes [107]. Sin embargo, el trabajo de investigación en los lactantes humanos no mostró ningún signo de absorción alterada de hierro con la fórmula infantil enriquecida con α -lactoalbúmina [108], lo que justifica más estudios para este beneficio biológico.

β caseína

La concentración total de caseína aumenta durante la lactancia y representa alrededor de 10 a 20% durante las etapas tempranas y 40 a 40% cuando la lactancia madura [109, 110]. En la leche madura, la β caseína representa hasta 25% o aproximadamente 2.7 g/L en la LM [58]. Esta proteína está altamente fosforilada, lo cual por lo menos en un modelo preclínico ha mostrado que solubiliza el calcio y la captación por las células intestinales, por lo menos en parte, al formar fosfopéptidos de caseína que actúan como ionóforos de calcio o

transportadores de calcio a través de la membrana [111, 112]. Falta por hacer más investigación para dilucidar el papel de los fosfopéptidos de caseína en el aumento de la captación de otros cationes divalentes como zinc e incluso el hierro.

Conclusión

Hallazgos recientes sobre las proteínas nutritivas y bioactivas de la leche materna apoyan las recomendaciones de la OMS de que la alimentación al seno materno debe continuarse durante el primer año y más allá. Los fabricantes de fórmulas infantiles deben eliminar del mercado las fórmulas de alto contenido de proteínas. Las nuevas fórmulas para lactantes deben ser de bajo contenido proteínico, en particular las fórmulas de seguimiento y las leches para el crecimiento. La calidad de la proteína de las fórmulas (perfiles de aminoácidos) deben ser más cercanas a las de la LM. Antes de agregar proteínas bioactivas a las fórmulas infantiles, los fabricantes deben proporcionar pruebas de seguridad y eficacia.

Declaración

F.HY. es miembro del consejo del Nestlé Nutrition Institute, una asociación suiza sin afán de lucro la cual recibe donaciones educacionales de Nestec S.A, Suiza, y otras fuentes. S.K.T es empleado del Nestlé Research Center, Lausana, Suiza.

Referencias

1. Haschke F, et al: Feeding patterns during the first 2 years and health outcome. *Ann Nutr Metab* 2013;62(suppl 3):16–25.
2. Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;386:743–800.
3. Fomon SJ: Requirements and recommended dietary intakes of protein during infancy. *Pediatr Res* 1991;30:391–395.
4. Heinig MJ, et al: Energy and protein intakes of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life and their association with growth velocity: the DARLING Study. *Am J Clin Nutr* 1993;58:152–161.
5. Lonnerdal B, Erdmann P, Thakkar SK, Sauser J, Destaillats F: Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *J Nutr Biochem* 2016;41:1–11.
6. Donovan SM, et al: Partition of nitrogen intake and excretion in low-birth-weight infants. *Am J Dis Child* 1989;143:1485–1491.
7. Fomon SJ, et al: Body composition of reference children from birth to age 10 years. *Am J Clin Nutr* 1982;35(suppl):1169–1175.
8. Zhang Z, et al: Amino acid profiles in term and preterm human milk through lactation: a systematic review. *Nutrients* 2013;5:4800–4821.
9. Ziegler EE, et al: Body composition of the reference fetus. *Growth* 1976;40:329–341
10. Haschke F, Grathwohl D, Haiden N: Metabolic programming: effects of early nutrition on growth, metabolism and body composition. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2016;86:87–95.
11. Dewey KG, et al: Breast-fed infants are leaner than formula-fed infants at 1 y of age: the DARLING study. *Am J Clin Nutr* 1993;57:140–145.
12. Weber M, et al: Lower protein content in infant formula reduces BMI and obesity risk at school age: follow-up of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2014;99:1041–1051.
13. Axelsson IE, Ivarsson SA, Raiha NC: Protein intake in early infancy: effects on plasma amino acid concentrations, insulin metabolism, and growth. *Pediatr Res* 1989;26:614–617.
14. Socha P, et al: Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2011;94(suppl):1776S–1784S.
15. Alexander DD, et al: Growth of infants consuming whey-predominant term infant formulas with a protein content of 1.8 g/100 kcal: a multicenter pooled analysis of individual participant data. *Am J Clin Nutr* 2016;104:1083–1092.
16. Raiha NC, et al: Whey predominant, whey modified infant formula with protein/energy ratio of 1.8 g/100 kcal: adequate and safe for term infants from birth to four months. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35:275–281.
17. Haschke F, et al: Postnatal high protein intake can contribute to accelerated weight gain of infants and increased obesity risk. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2016;85:101–109.
18. WHO: WHO Child Growth Standards: Length/Height-for-Age, Weight-for-Age, Weight-for-Length, Weight-for-Height and Body Mass Index-for-Age, Methods and Development. Geneva, WHO, 2016.
19. Inostroza J, et al: Low-protein formula slows weight gain in infants of overweight mothers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59:70–77.
20. Ziegler EE, et al: Adequacy of infant formula with protein content of 1.6 g/100 kcal for infants between 3 and 12 months. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;61:596–603.
21. Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen-Rivers LA: Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *J Pediatr* 1995; 126:696–702.
22. Isolauri E: Development of healthy gut microbiota early in life. *J Paediatr Child Health* 2012;48(suppl 3):1–6.

23. Blanc B, Bujard E, Mauron J: The amino acid composition of human and bovine lactotransferrins. *Experientia* 1963;19:299–301.
24. Siqueiros-Cendon T, et al: Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacol Sin* 2014;35:557–566.
25. Lonnerdal B, Iyer S: Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 1995;15:93–110.
26. Rai D, et al: Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014;54:1539–1547.
27. Lonnerdal B: Bioactive proteins in breast milk. *J Paediatr Child Health* 2013;49(suppl 1):1–7.
28. Actor JK, Hwang SA, Kruzal ML: Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des* 2009;15:1956–1973.
29. Tomita M, et al: Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci* 1991;74:4137–4142.
30. Edde L, et al: Lactoferrin protects neonatal rats from gut-related systemic infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1140–G1150.
31. Bruni N, et al: Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules* 2016;21:E752.
32. Brouwer CP, Rahman M, Welling MM: Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. *Peptides* 2011;32:1953–1963.
33. Goldman AS, et al: Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *J Paediatr* 1982;100:563–567.
34. Lycke N, et al: Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J Immunol* 1999;163:913–919.
35. Silvey KJ, et al: Role of immunoglobulin A in protection against reovirus entry into Murine Peyer's patches. *J Virol* 2001;75:10870–10879.
36. Forbes SJ, et al: Transient suppression of Shigella flexneri type 3 secretion by a protective O-antigen-specific monoclonal IgA. *MBio* 2011;2:e00042-11.
37. Stokes CR, Soothill JF, Turner MW: Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* 1975;255:745–746.
38. Ashkar S, et al: Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000;287:860–864.
39. Schack L, et al: Considerable variation in the concentration of osteopontin in human milk, bovine milk, and infant formulas. *J Dairy Sci* 2009;92:5378–5385.
40. Maeno Y, et al: Effect of osteopontin on diarrhea duration and innate immunity in suckling mice infected with a murine rotavirus. *Viral Immunol* 2009;22:139–144.
41. Pabst HF, et al: Differential modulation of the immune response by breast- or formula-feeding of infants. *Acta Paediatr* 1997;86:1291–1297.
42. Azuma N, Maeta A, Fukuchi K, Kanno C: A rapid method for purifying osteopontin from bovine milk and interaction between osteopontin and other milk proteins. *Int Dairy J* 2006;16:370–378.
43. Lonnerdal B, et al: Growth, nutrition, and cytokine response of breast-fed infants and infants fed formula with added bovine osteopontin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;62:650–657.
44. Soder O: Isolation of interleukin-1 from human milk. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;83:19–23.
45. Hooton JW, et al: Human colostrum contains an activity that inhibits the production of IL-2. *Clin Exp Immunol* 1991;86:520–524.
46. Sarfati M, et al: Presence of IgE suppressor factors in human colostrum. *Eur J Immunol* 1986;16:1005–1008.
47. Munoz C, et al: Interleukin-1 beta in human colostrum. *Res Immunol* 1990;141:505–513.
48. Rudloff HE, et al: Tumor necrosis factor-alpha in human milk. *Pediatr Res* 1992;31:29–33.
49. Saito S, et al: Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production. *J Reprod Immunol* 1991;20:267–276.
50. Garofalo R, et al: Interleukin-10 in human milk. *Pediatr Res* 1995;37:444–449.
51. Eglinton BA, Robertson DM, Cummins AG: Phenotype of T cells, their soluble receptor levels, and cytokine profile of human breast milk. *Immunol Cell Biol* 1994;72:306–313.
52. Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR: Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev* 1993;14:710–728.
53. Lonnerdal B: Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Adv Exp Med Biol* 2004;554:11–25.
54. Lonnerdal B: Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1537S–1543S.
55. Golinelli LP, Del Aguila EM, Flosi Paschoalini VM, Silva JT, Conte-Junior CA: Functional aspect of colostrum and whey proteins in human milk. *J Hum Nutr Food Sci* 2014;2:1035.
56. Cooper CA, Maga EA, Murray JD: Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Res* 2015;24:605–614.
57. Lee-Huang S, et al: Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2678–2681.
58. Cuilliere ML, et al: Changes in the kappa-casein and beta-casein concentrations in human milk during lactation. *J Clin Lab Anal* 1999;13:213–218.
59. Stromqvist M, et al: Human milk kappa-casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:288–296.
60. Shin K, Tomita M, Lonnerdal B: Identification of lactoperoxidase in mature human milk. *J Nutr Biochem* 2000;11:94–102.
61. Steele WF, Morrison M: Antistreptococcal activity of lactoperoxidase. *J Bacteriol* 1969;97:635–639.
62. Bjorck L, et al: Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Appl Microbiol* 1975;30:199–204.
63. Aoki Y, Kobayashi K, Kajii T: Enzyme-linked immunoassay of haptocorrin: analysis of milk and granulocytes. *Biochem Med Metab Biol* 1992;47:189–194.
64. Adkins Y, Lonnerdal B: Potential host-defense role of a human milk vitamin B-12-binding protein, haptocorrin, in the gastrointestinal tract of breast-fed infants, as assessed with porcine haptocorrin in vitro. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1234–1240.
65. Jensen HR, et al: Effect of the vitamin B12-binding protein haptocorrin present in human milk on a panel of commensal and pathogenic bacteria. *BMC Res Notes* 2011;4:208.
66. Lonnerdal B, Lien EL: Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. *Nutr Rev* 2003;61:295–305.
67. Permyakov EA, Berliner LJ: Alpha-lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett* 2000;473:269–274.
68. Pellegrini A, et al: Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta* 1999;1426:439–448.
69. Wada Y, Lonnerdal B: Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action. *J Nutr Biochem* 2014;25:503–514.
70. Hakansson A, et al: A folding variant of alpha-lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 2000;35:589–600.
71. Lien EL: Infant formulas with increased concentrations of alpha-lactalbumin. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1555S–1558S.
72. Blackberg L, et al: The bile salt-stimulated lipase in human milk is an evolutionary newcomer derived from a non-milk protein. *FEBS Lett* 1980;112:51–54.
73. Freudenberg E: Lipase of human milk; studies on its enzymological and nutritional significance. *Bibl Paediatr* 1953;9:1–68.
74. Blackberg L, Hernell O: The bile-salt-stimulated lipase in human milk. Purification and characterization. *Eur J Biochem* 1981;116:221–225.
75. Blackberg L, et al: Bile salt-stimulated lipase in human milk and carboxyl ester hydrolase in pancreatic juice: are they identical enzymes? *FEBS Lett* 1981;136:284–288.
76. Hernell O, Blackberg L: Digestion of human milk lipids: physiologic significance of sn-2 monoacylglycerol hydrolysis by bile salt-stimulated lipase. *Pediatr Res* 1982;16:882–885.
77. Lindquist S, Hernell O: Lipid digestion and absorption in early life: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:314–320.
78. Fredrikzon B, et al: Bile salt-stimulated lipase in human milk: evidence of activity in vivo and of a role in the digestion of milk retinol esters. *Pediatr Res* 1978;12:1048–1052.
79. Andersson Y, et al: Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. *Acta Paediatr* 2007;96:1445–1449.
80. Casper C, et al: Recombinant bile salt-stimulated lipase in preterm infant feeding: a ran-

- domized phase 3 study. *PLoS One* 2016; 11:e0156071.
81. Heitlinger LA, et al: Mammary amylase: a possible alternate pathway of carbohydrate digestion in infancy. *Pediatr Res* 1983;17:15–18.
 82. Lindberg T, Skude G: Amylase in human milk. *Pediatrics* 1982;70:235–238.
 83. Dewit O, Dibba B, Prentice A: Breast-milk amylase activity in English and Gambian mothers: effects of prolonged lactation, maternal parity, and individual variations. *Pediatr Res* 1990;28:502–506.
 84. Hegardt P, et al: Amylase in human milk from mothers of preterm and term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984;3:563–566.
 85. McGilligan KM, Thomas DW, Eckhart CD: Alpha-1-antitrypsin concentration in human milk. *Pediatr Res* 1987;22:268–270.
 86. Davidson LA, Lonnerdal B: Fecal alpha 1-antitrypsin in breast-fed infants is derived from human milk and is not indicative of enteric protein loss. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:137–141.
 87. Wright G, et al: High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)* 1991;9:830–834.
 88. Carver A, et al: Expression of human alpha 1 antitrypsin in transgenic sheep. *Cytotechnology* 1992;9:77–84.
 89. Donovan SM, Odle J: Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu Rev Nutr* 1994;14:147–167.
 90. Playford RJ, Macdonald CE, Johnson WS: Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr* 2000;72:5–14.
 91. Dvorak B, et al: Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatr Res* 2003;54:15–19.
 92. Buccigrossi V, et al: Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. *Pediatr Res* 2007;61:410–414.
 93. Reznikov EA, et al: Dietary bovine lactoferrin increases intestinal cell proliferation in neonatal piglets. *J Nutr* 2014;144:1401–1408.
 94. Hernel O, Lonnerdal B: Iron status of infants fed low-iron formula: no effect of added bovine lactoferrin or nucleotides. *Am J Clin Nutr* 2002;76:858–864.
 95. Saarinen UM, Siimes MA, Dallman PR: Iron absorption in infants: high bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J Pediatr* 1977;91:36–39.
 96. Kawakami H, Lonnerdal B: Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am J Physiol* 1991;261:G841–G846.
 97. Suzuki YA, et al: Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:190–199.
 98. Burger RL, Allen RH: Characterization of vitamin B12-binding proteins isolated from human milk and saliva by affinity chromatography. *J Biol Chem* 1974;249:7220–7227.
 99. Seetharam B, Alpers DH: Absorption and transport of cobalamin (vitamin B12). *Annu Rev Nutr* 1982;2:343–369.
 100. Adkins Y, Lonnerdal B: Mechanisms of vitamin B(12) absorption in breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:192–198.
 101. Nygren-Babol L, Jagerstad M: Folate-binding protein in milk: a review of biochemistry, physiology, and analytical methods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012;52:410–425.
 102. Ford JE, Salter DN, Scott KJ: A folate-protein complex in cow's milk. *Proc Nutr Soc* 1969; 28:39A–40A.
 103. Ford JE: Observations on the possible nutritional significance of vitamin-binding proteins in milk. *Proc Nutr Soc* 1974;33:15A.
 104. Ford JE: Some observations on the possible nutritional significance of vitamin B12-and folate-binding proteins in milk. *Br J Nutr* 1974;31:243–257.
 105. Wigertz K, Svensson UK, Jagerstad M: Folate and folate-binding protein content in dairy products. *J Dairy Res* 1997;64:239–252.
 106. Indyk HE, Filonzi EL, Gapper LW: Determination of minor proteins of bovine milk and colostrum by optical biosensor analysis. *J AOAC Int* 2006;89:898–902.
 107. Kelleher SL, et al: Glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1261–1268.
 108. Szymlek-Gay EA, et al: α -Lactalbumin and casein-glycomacropeptide do not affect iron absorption from formula in healthy term infants. *J Nutr* 2012;142:1226–1231.
 109. Kunz C, Lonnerdal B: Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr* 1992;81:107–112.
 110. Kunz C, Lonnerdal B: Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *Am J Clin Nutr* 1990;51:37–46.
 111. Sato R, Noguchi T, Naito H: Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1986;32:67–76.
 112. Ferraretto A, et al: Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells. *J Nutr* 2001; 131:1655–1661.
 113. Liu KY, et al: Natural killer cell populations and cytotoxic activity in pigs fed mother's milk, formula, or formula supplemented with bovine lactoferrin. *Pediatr Res* 2013;74:402–407.
 114. Hurley WL, Theil PK: Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* 2011;3:442–474.