

Componentes biológicamente activos de la leche materna

Bioactive compounds derived from human milk

BARÓ L¹, JIMÉNEZ J¹, MARTÍNEZ-FÉREZ A², BOZA JJ¹.

¹Puleva Biotech S.A. Camino de Purchil 66, 18004 Granada. ²Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Granada. E-mail: Ibaro@puleva.es

RESUMEN

La leche materna es un complejo fluido biológico que aporta la energía y los nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento del recién nacido. Pero además, la leche materna contiene toda una serie de compuestos bioactivos como enzimas, hormonas, factores de crecimiento, proteínas específicas, poliaminas, nucleótidos, oligosacáridos, etc., que ejercen efectos biológicos y que en conjunto reciben el nombre de “factores tróficos de la leche”. Estos compuestos bioactivos son considerados nutrientes potencialmente esenciales en periodos de desarrollo y en determinadas enfermedades, cuando la capacidad de síntesis no supera las necesidades de los mismos. Aunque las fórmulas infantiles aportan todos los nutrientes para un adecuado desarrollo del recién nacido, carecen de muchos de estos compuestos. Este artículo pretende realizar una revisión acerca de los conocimientos actuales sobre los efectos biológicos de la lactoferrina, nucleótidos, poliaminas y oligosacáridos.

PALABRAS CLAVE: Leche humana. Lactoferrina. Nucleotidos. Poliaminas.

ABSTRACT

Breast milk is a biological fluid complex, which provides the essential energy and nutrients for the development and growth of newborn children. Breast milk also contains a range of bioactive compounds such as: enzymes, hormones, growth factors, specific proteins, polyamines, nucleotides, oligosaccharides, etc. that have a biological effect. These compounds, as a whole, are called “milk trophic factors”. When synthetic capability does not meet functional demands, these bioactive compounds are considered as potentially essential nutrients during growth periods or during certain diseases. Infant formulae provide the necessary nutrients for the suitable development of the newborn child, although they lack many of these compounds. This research tries to review current knowledge about the biological effects of lactoferrin, nucleotides, polyamines and oligosaccharides.

KEY WORDS: Human milk. Lactoferrin. Nucleotides. Polyamines. Oligosaccharides.

INTRODUCCIÓN

La leche humana es el alimento ideal en los primeros meses del vida del niño. La composición de la leche humana está adaptada, al igual que en cada especie, a las necesidades nutricionales del recién nacido, siendo su composición distinta en cada especie de mamífero. Además de los nutrientes necesarios para el crecimiento de los recién nacidos (proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales, vitaminas), la leche hu-

INTRODUCTION

Breast milk is the ideal nourishment for newborn children. Breast milk composition meets the nutritional needs of a newborn child. This fact is the same for all species, although breast milk composition is different for each mammal. Breast milk (and the necessary nutrients for the growth of a newborn child – proteins, fats, carbohydrates, minerals, vitamins) is the origin of a range of compounds with critical biochemical and phy-

mana es fuente de toda una serie de compuestos con importantes actividades bioquímicas y fisiológicas de gran importancia para el desarrollo y crecimiento de numerosos órganos y tejidos del recién nacido, y numerosos factores de defensa contra antígenos y agentes patógenos. Así, la leche humana contiene hormonas y factores de crecimiento, enzimas, proteínas y péptidos bioactivos, nucleótidos y poliaminas, oligosacáridos, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, y un largo etcétera. Desgraciadamente, nuestros conocimientos actuales sobre el papel biológico de estas sustancias es limitado, aunque existen suficientes datos para apoyar la hipótesis de que ejercen importantes funciones en el desarrollo y crecimiento del recién nacido. La tabla 1 recoge un breve resumen de algunos de estos compuestos de especial importancia.

En base a todos estos conocimientos, se ha sugerido incluso la suplementación de formulas infantiles con algunos de estos componentes para el tratamiento de determinadas patologías. Una aproximación a este capítulo se recoge en la tabla 2 recogida de Bohles et al (1998):

biological properties for the development and growth of a newborn child's organs and tissues, as well as providing defence mechanisms against antigens and pathogenic agents. Breast milk contains hormones, growth factors, enzymes, proteins, bioactive peptides, nucleotides, polyamines, oligosaccharides, long-chain polyunsaturated fatty acids, etc. Unfortunately, we have limited knowledge about the biological role of these substances. However, there is substantial data to support the hypothesis concerning the critical role of these substances for a newborn child's development and growth. Table 1 shows information related to some of these vital compounds.

Based on previous knowledge, the addition of some of these compounds to infant formulae has been suggested for certain pathological treatments. This information is shown in Table 2 (Bohles et al, 1998).

TABLA I. Sitios de acción para distintos componentes bioactivos de la leche humana.

	Lugar de acción en el tracto gastrointestinal		
	Epitelio	Sistema inmune	Sistema nervioso
IGF-1	+	-	-
Poliaminas	+	-	-
TGF	+	+	-
Lactoferrina	+	+	-
Prolactina	+	+	-
TNF- α	+	+	-
IL-6	-	+	-
IL-10	-	+	-
Peptido vasoactivo	-	+	+
Sustancia P	-	+	+
Somatostatina	-	+	+

Goldman et al., 2000

TABLE I. Places of action of different bioactive compounds derived from breastmilk.

	Place of action in the gastrointestinal tract		
	Epithelium	Immune system	Nervous system
IGF-1	+	-	-
Polyamines	+	-	-
TGF	+	+	-
Lactoferrin	+	+	-
Prolactin	+	+	-
TNF- α	+	+	-
IL-6	-	+	-
IL-10	-	+	-
Vasoactive peptide	-	+	+
P substance	-	+	+
Somatostatin	-	+	+

Goldman et al., (2000)

TABLA II. Suplementos en fórmula infantiles destinados al tratamiento de determinadas patologías.

Patología	Suplementación sugerida
Síndrome de intestino corto	EGF, nucleótidos, poliaminas, glutamina, vitaminas
Inflamación crónica	Ácidos grasos w-3, vitamina E, carnitina, antioxidantes, cisteína
Infecciones	Antioxidantes, cisteína , oligosacáridos, lisozima, lactoferrina
Diarrea	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, taurina, antioxidantes, cisteína , nucleótidos, lactoferrina, lisozima

Bohles et al (1998)

TABLA II. Supplements in infant formulae destined to specific pathologies treatment.

Pathology	Suggested supplementation
Small intestine syndrome	EGF, nucleotides, polyamines, glutamine, vitamins
Chronic inflammation	Fatty acids w-3, vitamin E, carnitine, antioxidants, cysteine
Infections	Antioxidants, cysteine , oligosaccharides, lysozyme, lactoferrin
Diarrhea	Long-chain polyunsaturated fatty acids, taurine, antioxidants, cysteine , nucleotides, lactoferrin, lysozyme

Bohles et al (1998)

LACTOFERRINA

La lactoferrina es uno de los componentes más importantes de las proteínas de la leche materna, constituyendo alrededor del 10-15% de las mismas. El calostro contiene 2-3 g por litro y en la leche madura desciende al 1-1,5% (Lonnerdal et al, 1976). La lactoferrina es una glicoproteína de peso molecular alrededor de 80.000 que es capaz de unirse a dos átomos de hierro férrico, conjuntamente con los aniones bicarbonato o carbonato. Debido a esta capacidad de ligante de hierro, se le ha atribuido funciones de mantenimiento del status de hierro en el periodo neonatal y propiedades inhibitorias del crecimiento bacteriano como se describe más adelante.

Esta proteína posee la capacidad de resistir a la proteólisis, especialmente en su forma saturada de hierro, por tanto, puede resistir en el intestino del lactante la acción de las enzimas pancreáticas y pepsina. Prueba de ello es la recuperación de lactoferrina intacta en las deposiciones de lactantes alimentados al pecho o con lactancia artificial en numerosos estudios (Brines et al, 1983; Davison et al, 1987). También se ha hallado en orina lo que prueba que estas moléculas no sólo pueden resistir las digestión sino también ser absorbidas y excretadas intactas (Hutchens et al, 1991). Debido a estas capacidades y dadas sus importantes funciones biológicas descritas más adelante, está siendo añadida a preparados para lactantes. Para ello existen preparados comerciales de lactoferrina bovina y se investiga en la obtención de lactoferrina humana recombinante insertando el gen en el genoma de la levadura de cerveza, células renales de hámster, *Aspergillus* y vaca.

Funciones biológicas atribuidas a la lactoferrina

Se han propuesto numerosas funciones fisiológicas, aunque unas deben ser consideradas con más precaución que otras. A continuación describimos las más importantes.

Papel de la lactoferrina en la absorción de hierro

A partir del conocimiento de que una parte significativa del hierro en la leche humana va unida a la lactoferrina, se ha formulado la hipótesis de que la lactoferrina podría favorecer la

LACTOFERRIN

Lactoferrin is one of the most important breast milk protein components (from 10 to 15 per cent). Colostrum contains 2-3g of lactoferrin per litre and this amount decreases to 1-1.5% in mature milk (Lonnerdal et al, 1976). Lactoferrin is a glycoprotein with a molecular weight around 80,000, and is able to link to two ferric iron atoms, together with hydrogen carbonate or carbonate anions. Due to this iron binding capacity, it can maintain iron levels during the neonatal period and also has properties that inhibits the growth of bacteria, as will be described later.

This protein is able to resist proteolysis (especially iron saturate proteolysis): it can resist the action of pancreatic enzymes and pepsin in an infant's intestine. This is shown in several research works (Brines et al, 1983; Davison et al, 1987) into the recovery of intact lactoferrin in the faeces of breast or artificially feeding infants. Intact lactoferrin has also been found in urine, which means that these molecules may resist digestion, but they can also be absorbed and later be excreted without alteration (Hutchens et al, 1991). Lactoferrin is added to infant formulae due to these capacities and also to its critical biological functions, which will be described later. There are commercial supplements containing bovine lactoferrin, but several research projects are being carried out to obtain recombinant human lactoferrin by introducing the gen into the genome of brewery yeast, hamster renal cells, *aspergillus* and cows.

Lactoferrin biological functions

Many physiological functions have been attributed to lactoferrin, but some must be studied more carefully than others. Now, we will describe the most important functions.

Lactoferrin function in iron absorption

The hypothesis concerning the positive role of lactoferrin in the iron absorption of infants feeding on breast milk has been posed, since we know that an important ratio of the iron in breast milk is linked to lactoferrin. This hypothesis can be supported by the fact a portion of lactoferrin is able to escape from digestion, and enough lactoferrin exists to bind all of the iron in breast

absorción de hierro en los lactantes alimentados con leche materna. La capacidad de una parte de la lactoferrina de escapar a la digestión, así como la existencia de lactoferrina suficiente como para ligar la totalidad del hierro de la leche humana apoyan esta hipótesis (Lonnerdal, 1997). Más aun, es conocido que los niños alimentados con leche materna utilizan el hierro que ésta aporta de un modo más efectivo que aquellos alimentados con preparados para lactantes enriquecidos en hierro. Así se ha observado que los lactantes alimentados con leche materna, que contiene 0,2-0,4 mg de hierro por litro, tiene un status de hierro a los seis meses de edad mejor que el de los alimentados con preparados para lactantes que tenían una mayor cantidad de hierro (0,7 mg/l) (Fransson et al, 1980). Saarinen et al (1977) encontraron una absorción del 50% del hierro en leche humana y del 20% en fórmulas infantiles. Sin embargo, diversos estudios realizados con aporte de lactoferrina bovina no encuentran diferencias significativas respecto de su adición o no a preparados con sulfato ferroso, argumentándose que esta falta de efecto puede deberse a que la lactoferrina bovina es incapaz de unirse a los receptores intestinales humanos (Lonnerdal, 1997).

Papel de la lactoferrina como antimicrobiano, antiviral y antifúngico

Se han sugerido diversos mecanismos responsables de la actividad antimicrobiana de la lactoferrina (Naidu et al, 1997):

- Debido a su alta afinidad sobre el hierro, actuaría secuestrando al mismo impidiendo su utilización por las bacterias y por tanto inhibiendo su multiplicación.
- Mediante producción de alteraciones en la membrana bacteriana que conducirían a pérdida de su integridad y muerte de las bacterias. Se ha demostrado que la lactoferrina podría liberar lipopolisacáridos de las membranas celulares de las bacterias Gram (-), y también, podrían unirse a un grupo de moléculas llamadas porinas induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana.
- Mediante estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos.

Esta capacidad antimicrobiana no es exclusiva de la lactoferrina integra, sino que se ha demostrado la existencia de derivados procedentes

milk (Lonnerdal, 1997). Moreover, it is also known that children on breast milk use iron in breast milk more effectively than those children fed iron-enriched infant formulae. By the age of six months, Infants fed breast milk – with 0.2 to 0.4 mg iron per litre – show a better level of iron than those infants fed infant formulae – with 0.7 mg/l (Fransson et al, 1980). Saarinen et al (1997) discovered that iron in breast milk was 50% absorbed while the iron in infant formulae was 20% absorbed. Several research projects related to the addition of bovine lactoferrin have shown that there are no significant differences between adding and not adding lactoferrin to formulae with ferrous sulphate. It is deduced that this lack of effect may be due to the inability of bovine lactoferrin to link to human intestinal receptors (Lonnerdal, 1997).

Antibacterial, antiviral and antimycotic functions of lactoferrin

Several mechanisms have been suggested to justify lactoferrin antibacterial activity (Naidu et al, 1997):

- Lactoferrin abducts iron due to its high affinity with it. This fact prevents bacteria from using iron and, subsequently, bacteria would not multiply.
- By altering bacterial cell walls, bacteria would lose their integrity and die. It has been shown that lactoferrin could liberate those lipopolysaccharides of the Gram-negative bacteria cell walls. Lipopolysaccharides could also link to a group of molecules called porins, causing changes in the wall cell permeability.
- By stimulating phagocytosis by macrophages and monocytes.

Native lactoferrin has an antibacterial capacity. It has been shown that formulae derived from the digestion of lactoferrin also share this capacity. Kuwata et al (1998) defend the production of antibacterial peptides (lactoferricin) derived from the digestion of bovine lactoferrin intake.

During recent years, special attention has been paid to lactoferrin. Action mechanisms have not been established yet, but they seem to be related to the inhibition of the adsorption process of the viral particle by the cell. This protective effect has been shown in vitro research with cytomegalovirus (CMV), Herpes simplex and hepatitis C,

de la digestión de la misma con dicha capacidad. Kuwata et al (1998), evidencian la generación de péptidos antimicrobianos (lactoferrina) resultantes de la digestión de la ingesta oral de lactoferrina bovina.

En los últimos años ha cobrado gran interés la actividad antiviral de la lactoferrina. Los mecanismos de acción no están del todo claros, pero parecen estar relacionados con la inhibición del proceso de adsorción de la partícula viral por parte de la célula. Se ha encontrado este efecto protector en estudios in vitro con citomegalovirus, Herpes simplex, hepatitis C y otros (Marcheti et al, 1998; Yi et al, 1997).

Si bien la mayoría de los estudios evidencian un efecto antimicrobiano y antiviral de la lactoferrina, existen otros estudios que muestran un efecto fungistático de la leche humana mediada por lactoferrina debido a su capacidad ligante del hierro (Andersson et al, 2000).

A través de todos estos mecanismos, y de algún otro, la lactoferrina puede desempeñar un papel esencial en la protección del recién nacido frente a infecciones gastrointestinales. De hecho los niños alimentados con leche materna son más resistentes a las infecciones intestinales que los alimentados con preparados para lactantes, y se considera que este hecho podría ser debido, al menos en parte, a la lactoferrina humana (Lonnerdal, 1997).

Papel de la lactoferrina como factor de crecimiento

La lactoferrina parece estimular el crecimiento y la proliferación de la mucosa intestinal. Según Nichols et al (1987), la lactoferrina humana favorece la incorporación de la timidina en el ADN de las células de las criptas de rata. Este efecto no parece ser dependiente de la presencia de hierro en la lactoferrina humana y el hecho de que la mayor parte de la misma no está saturada de hierro parece apoyar esta hipótesis.

NUCLEÓTIDOS

Los nucleótidos son compuestos constituidos por una base nitrogenada purínica o pirimidínica, una pentosa y uno o varios grupos fosfatos. Los nucleótidos y sus metabolitos derivados desempeñan un papel clave en numerosos

amongst others (Marcheti et al, 1998; Yi et al, 1997).

Although most of the research proves an antibacterial and antiviral effect of lactoferrin, in other research the anti fungal effect of breast milk caused by lactoferrin, due to its iron binding capacity, has been demonstrated (Andersson et al, 2000).

Through these and other mechanisms, lactoferrin will play an essential role in the protection of the newborn child against gastro-intestinal infections. In fact, children fed breast milk are more resistant to intestinal infections than those children fed infant formulae. It is considered that this fact could be partially due to human lactoferrins (Lonnerdal, 1997).

Lactoferrina role as a growth factor

Lactoferrin seems to stimulate the growth and proliferation of the intestinal tract. According to Nichols et al (1987), human lactoferrin favours the addition of thymidine in the cell DNA of rats' crypts. This effect does not seem to depend on the existence of iron in human lactoferrin. This hypothesis may be supported because most of the lactoferrin is not iron saturated.

NUCLEOTIDES

Nucleotides are compounds made up of either a purine or a pyrimidine nitrogenous base, a pentose base or one or several phosphate groups. Nucleotides and their derived metabolites play a key role in biochemical and physiological processes, such as energy transfer processes, nucleic acid synthesis precursors (DNA and RNA), being critical for carbohydrates, lipids and protein synthesis. They also influence the immune system, lipid metabolism and hepatic functionality (Gil et al, 1995). Breast milk is the only source of nucleotides for newborn children during the early months. Breast milk characteristics are completely different to cow milk and infant formulae.

Nucleotides may be endogenously synthesized, however, they may become essential if this synthesis is not enough to fulfil the body's needs, although their absence does not cause deficiency (regarding the first definition of the concept). Certain pathologies are representative of these

procesos bioquímicos y fisiológicos, tales como procesos de transferencia de energía, precursores de la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y son claves en la síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas. También actúan sobre el sistema inmunitario, metabolismo lipídico y funcionalidad hepática (Gil et al, 1995). La leche humana es la exclusiva fuente de nucleótidos para el recién nacido en los primeros meses de vida y su perfil de nucleótidos es marcadamente diferente de la leche de vaca y de las fórmulas infantiles.

Los nucleótidos pueden ser sintetizados endógenamente, sin embargo, pueden llegar a ser esenciales cuando esta síntesis es insuficiente para cubrir las necesidades del organismo, aunque su ausencia no provoque carencia en el sentido clásico del término. Ejemplo de estas situaciones son determinadas patologías, situaciones que limiten la síntesis endógena, situaciones de carencias alimentarias y periodos de crecimiento rápido como ocurre en el recién nacido (Uauy, 1989). Por ello se recurre al término semiesencial para describir el papel de los nucleótidos en la nutrición humana. En base a lo anterior, el aporte exógeno de estos nutrientes en tales condiciones ahorraría al organismo el costo de la síntesis de nucleótidos o el de la vía de recuperación de los mismos, optimizando las funciones hísticas. Una de estas situaciones fisiológicas donde los nucleótidos desempeñan un papel semiesencial es la del recién nacido, situación que pasamos a tratar a continuación.

Recientes estudios sugieren que los nucleótidos de la dieta (leche materna) pueden ser semiesenciales para el recién nacido. Los tejidos en rápido desarrollo como el epitelio intestinal o las células linfoides necesitan una cantidad incrementada de nucleótidos. Estos pertenecen a la fracción nitrogenada no proteica de la leche materna que constituye entre el 18-30% del nitrógeno total, mientras que en la leche de vaca sólo constituye un 5%. Los nucleótidos representan del 2 al 5% de 1 nitrógeno no proteico de la leche. Esta cantidad no despreciable podría contribuir a la excelente utilización de la proteína por los niños alimentados con leche materna. Además de los nucleótidos hemos de destacar que la leche materna contiene significativas cantidades de compuestos relacionados, como nucleósidos, bases púricas y pirimidínicas, ácidos nucleicos y productos que se derivan de ellos,

situaciones: when endogenous synthesis is limited, during periods of food deficiency, and during periods of rapid growth (i.e. newborn children) (Uauy, 1989). That is why we use the term *semi-essential* to describe the role of nucleotides in human nutrition. Based on previous facts, we may suppose that the exogenous contribution provided by these nutrients would prevent nucleotide synthesis by the body as well as nucleotide recovery, which would cause the optimisation of tissue functions. For the newborn child, nucleotides play a semi-essential role. This physiological example is described as follows.

Current research suggests that dietary nucleotides (breast milk) may be semi-essential for newborn children. Fast growing tissues, such as intestinal epithelium or lymphoid cells, need an increased amount of nucleotides. These nucleotides belong to breast milk non-protein nitrogen fraction, which is 18-30% of total nitrogen, while in cow's milk it represents only 5%. Nucleotides represent 2-5% of milk non-protein nitrogen. This significant amount could contribute to the beneficial use of this protein by breast milk feeding children. Apart from nucleotides, we must highlight that breast milk has important amounts of related compounds, such as nucleosides, purine and pyrimidine bases, nucleic acids, and their derived compounds, such as uridine diphosphate galactose (Gil et al, 1995).

Based on solid research, which suggest breast milk nucleotides potential properties in relation to immunity, adsorption of iron, intestinal flora, lipid metabolism, and intestinal development, nucleotides are being added to infant formulae in order to approach breast milk composition.

Biological functions of nucleotides

Main functions of nucleotides are summarized in the following sections:

Nucleotides role in the modulation of immunological reaction

Despite mechanisms not being established yet, it is generally considered that exogenous nucleotides contribute to the maintenance of immunological reaction. Several studies related to murine models shows that the contribution of exogenous nucleotides, compared to those diets

como la uridina difosfato galactosa (Gil et al, 1995).

En base a los distintos estudios que sugieren el potencial de los nucleótidos de la leche materna en inmunidad, absorción de hierro, flora intestinal, metabolismo lipídico, y desarrollo intestinal, se están adicionando a las fórmulas infantiles con el fin de aproximarlas lo más posible a la leche materna.

Funciones biológicas atribuidas a los nucleótidos

Los principales efectos de los nucleótidos podemos resumirlos en los siguientes apartados:

Papel de los nucleótidos en la modulación de la respuesta inmune,-

En general se considera que los nucleótidos exógenos colaboran en el mantenimiento de la respuesta inmune, pese a que los mecanismos no están del todo claros. En estudios en modelos murinos, el aporte de nucleótidos exógenos frente a dietas exentas de los mismos se asocian a: 1) mortalidad por problemas del injerto frente al huésped; 2) rechazo de los injertos alogénicos; 3) hipersensibilidad cutánea retardada; 4) linfoproliferación inducida por los aloantígenos; 5) corrección de la inmunosupresión inducida por la malnutrición y la subalimentación; 6) actividad de las células asesinas y activación macrofágica; 7) resistencia al *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*; 8) capacidad fagocitaria de los macrófagos; 9) producción esplénica de interleuquina-2 (IL-2), expresión de los receptores de IL-2 y de los marcadores de superficie lyt-1; y 10) producción de inmunoglobulinas dependientes de células T (Carver, 1996).

Los datos referidos a la adición de nucleótidos a lactantes son más limitados. Carver et al (1991), encuentran en lactantes alimentados al pecho y con fórmulas adicionadas de nucleótidos, un aumento de la actividad de NK y producción de IL-2 respecto de aquellos alimentados con preparados libres de nucleótidos.

Papel de los nucleótidos en el tracto gastrointestinal

El epitelio intestinal es un tejido en continua renovación, de forma que en el hombre el conjunto del epitelio queda sustituido en el plazo de

without them may be associated to: 1) mortality caused by graft problems with the host; 2) rejection of allogenic grafts; 3) delayed cutaneous hypersensitivity; 4) lymphoid proliferation caused by allontigens; 5) adjustment of immunosuppression caused by malnutrition and nutrient deficiency; 6) cytotoxic T-cell activity and macrophobe activation; 7) resistance to *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*; 8) phagocytic capability of macrophages; 9) splenic production of interleukin-2 (IL-2), appearance of IL-2 receptors and lyt-1 surface markers; and 10) production of T-cell dependant immunoglobulins (Carver, 1996).

Data related to the addition of nucleotides addition to infant formula is limited. Carver et al (1991) find that in infants fed breast milk and in those fed nucleotides added formulae, an increase in NK activity and IL-2 production, compared to those children fed nucleotide-free formulae.

Nucleotides function in the gastrointestinal tract

The intestinal epithelium is a tissue in continuous development, and it is shown that the human epithelium is completely replaced in a period from 3 to 6 days. Nucleotides are necessary for this renewal, but not only endogenous nucleotides (hepatic synthesis and cellular refill), but also those nucleotides coming from the diet. *In vivo* and *in vitro* experiments prove that the purine novo synthesis is limited or inactive in intestine epithelial cells. Surveys carried out by scientists demonstrate that a nucleotide-free diet increases the activity of the most important enzyme in purine synthesis and phosphoribosil-pyrophosphate amino transferase. This fact leads us to think that the dietary nucleotides have an important effect in the maintenance of the intestinal nucleotides pool (Gil A et al, 1995).

Different studies have been carried out to assess nucleotides contribution to the diet, Thus, an increase of mucosa DNA values has been proven, as well as a higher height of microvellosities and an increased activity of disaccharides in weaned rats, which receive a nucleotide-supplemented diet (Uauy et al, 1990). Other authors demonstrate a higher development of mucosa and the proliferation of the crypt cells (Tsujinaka et al, 1993) in rats fed by total parenteral nutrition. *In vitro* researches, Tanaka et al (1996), suggest

3-6 días. Para esta renovación son necesarios los nucleótidos, pero no sólo los endógenos (síntesis hepática y recambio celular), sino que los de la dieta juegan también un importante papel. Experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que la síntesis de novo de purinas está limitada o inactivada en las células epiteliales del intestino. Estudios experimentales demuestran que la actividad de la enzima clave en la síntesis purinas, y fosforibosil pirofosfato amino transferasas se incrementa con una dieta libre de nucleótidos. Este hecho induce a pensar que los nucleótidos de la dieta desempeñan un importante papel en la mantenimiento del "pool" de nucleótidos intestinales (Gil A et al, 1995).

Se han realizado numerosos trabajos para valorar el aporte de los nucleótidos en la dieta. Así, se ha observado un aumento de los valores de ADN de la mucosa, con una mayor altura de las vellosidades y crecimiento de la actividad de las disacaridasas en ratas destetadas recibiendo una dieta suplementada con nucleótidos (Uauy et al, 1990). Otros autores, en ratas alimentadas con nutrición parenteral total, muestran un mayor desarrollo de la mucosa y proliferación de las células de las criptas (Tsujinaka et al, 1993). En estudios *in vitro*, Tanaka et al (1996), sugieren que un específico nucleótido exógeno, el AMP, tendría un importante papel en el control en el "turnover" de las células epiteliales del epitelio intestinal. Merece la pena destacar la importancia de los nucleótidos en situaciones patológicas como la diarrea crónica, donde la suplementación condiciona una normalización de la actividad de las sacaridasas y de la histología y arquitectura intestinales (Gil, et al, 1995).

Papel de los nucleótidos en el funcionamiento hepático

Si bien el hígado tiene un papel principal en la síntesis endógena de nucleótidos para el organismo, se ha visto que los nucleótidos exógenos son capaces de modular el crecimiento hepático y su regeneración. Este hecho a llevado a los investigadores a realizar numerosos trabajos en modelos animales con lesiones hepáticas inducidas experimentalmente. A partir de ellos se ha demostrado que la administración de nucleótidos mejora la función hepática y la recuperación de estas lesiones. En definitiva, estos estudios sugieren que la administración exógena de nu-

that specific exogenous nucleotide (AMP) would have an important effect controlling the epithelial cells 'turnover rate' from intestinal epithelium. It is important to highlight the importance of nucleotides in pathological situations, such as chronic diarrhoea, where supplementation determines the normalization of saccharidase activity and the intestinal histology and architecture (Gil, et al, 1995).

Nucleotides function in the hepatic process

Since the liver is essentially important for the endogenous synthesis of nucleotides in the human organism, it has been demonstrated that exogenous nucleotides are able to modulate the hepatic growth and regeneration. This fact has prompted scientists to perform numerous research studies on animal models suffering from experimentally induced hepatic damage. This research has proved that the administration of nucleotides improves the hepatic function and the subsequent recovery from these injuries. All in all, this research suggests that the exogenous administration of nucleotides may modify the composition, functions and regeneration capacity of the liver. This addition is especially important when the capacity of the liver to supply preformed nucleotides decreases because of the existence of a hepatic injury disease (Carver, 1996).

Nucleotides function in the lipidic metabolism

Several researches prove the effect of dietary nucleotides, concerning the profile of fatty acids; they cause an increase in plasmatic and corpuscular concentrations of long chain polyunsaturated fatty acids in animal models (Boza et al, 1992; Jimenez et al, 1992) as well as in newborn children (Gil et al, 1986). These researches suggest that these exogenous nucleotides would favour an elongation to 20 carbon atoms of the essential fatty acids. Another mechanism may be related to the inhibition of desaturase activity at high levels 18:2n-6 (linoleic acid) in the diet (certain infant formulae). As a consequence, dietary nucleotides may favour the essential fatty acids desaturation and elongation, reversing desaturase inhibition in situations where there is an excess of substrate (linoleic acid) in the diet (Martínez-Valverde et al, 1996).

cleótidos es susceptible de modificar la composición, las funciones y la capacidad de regeneración del hígado, siendo esta adicción particularmente importante cuando, por la existencia de lesión o enfermedad hepática, la capacidad del hígado para suministrar nucleótidos preformados estuviera disminuida (Carver, 1996).

Papel de los nucleótidos en el metabolismo lipídico

Se han llevado a cabo diversos estudios que muestran el efecto de los nucleótidos de la dieta en el perfil de ácidos grasos, provocando un aumento de las concentraciones plasmáticas y eritrocitarias de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga tanto en modelos animales (Boza et al, 1992; Jimenez et al, 1992) como en recién nacidos (Gil et al, 1986). Esos trabajos sugieren que los nucleótidos exógenos favorecerían la elongación a 20 átomos de carbono de los ácidos grasos esenciales. Otro mecanismo de actuación podría estar relacionado con la inhibición de la actividad de las desaturasas por altos niveles de 18:2n-6 (ácido linoleico) en la dieta (caso de algunos preparados para lactantes). De esta forma, los nucleótidos de la dieta favorecerían la desaturación y elongación de los ácidos grasos esenciales revertiendo la situación de inhibición de las desaturasas en situaciones de exceso de sustrato (ácido linoleico) en la dieta (Martínez-Valverde et al, 1996).

POLIAMINAS

Las poliaminas son un grupo de compuestos nitrogenados presentes en tejidos animales, bacterias y virus. Sus concentraciones varían según tejidos y órganos, pero éstas aumentan durante los periodos de proliferación rápida, estimulando la síntesis proteica y la acumulación de nucleótidos. Por ello, son buenos marcadores del desarrollo y la proliferación de la mucosa intestinal y páncreas. En definitiva son esenciales para el crecimiento y diferenciación celulares (George et al, 1989). Las poliaminas reciben distintos nombres, putrescina (diamina), espermidina y espermina (poliaminas).

La leche humana contiene cantidades importantes de poliaminas y su papel en la nutrición del neonato no está del todo establecida. Si bien su cualificación varía según los diversos autores,

POLYAMINES

Polyamines are a group of nitrogenous compounds, which are present in animal tissues, bacteria and viruses. Polyamine concentrations vary depending on tissues and organs, but these may increase during fast proliferation periods, stimulating protein synthesis and the accumulation of nucleotides. For this reason, polyamines are good indicators of intestinal mucosa and pancreas development and proliferation. All in all, they are essential for cellular growth and differentiation (George et al, 1989). Polyamines have various names, such as putrescine (diamine), spermidine and spermine (polyamines).

Breast milk contains important amounts of polyamines, but its role in neonatal nutrition is not defined yet. Although the properties of polyamines vary depending on the author, it seems there is no doubt about the concentration of the polyamines profile: spermine > spermidine > putrescine, with a spermidine/spermine ratio of 0.78-0.86. Buts et al (1995) establish an average concentration of spermine, spermidine and putrescine in breast milk of 313, 220 and 24 nmol/dl, respectively. Numerous factors modify the amount of breast milk polyamines, such as genetic factors, the pre-weaning period, environmental factors and, especially, the nutritional state and the ingested diet. As an example, these authors describe that during the postpartum first week, putrescine levels remain low while concentrations of two other polyamines increase considerably during the first three days, until they reach values between 8 and 10 times higher than in the postpartum first day.

There is a lower concentration of polyamines in infant formulae than in breast milk. Buts et al, (1995) estimate that the level of polyamines in newborn children fed powdered infant formulae is 10 times lower than the level of polyamines in children fed breast milk. Moreover, Capano et al (1998) suggest that only breast milk (cow milk and infant formulae are excluded) contains enough polyamines to prevent the inhibition of the intestine cellular development in a cellular model, where the synthesis of polyamines is inhibited.

parece claro que la concentración de poliaminas muestra el siguiente perfil: espermina>espermidina >putrescina, con una relación de espermidina/espermina de 0.78-0.86. Buts et al (1995), determinan una concentración media de espermina, espermidina y putrescina en leche humana de 313, 220 y 24 nmol/dl respectivamente. Numerosos factores modifican la cantidad de poliaminas en leche humana, como factores genéticos, fase de la lactancia, factores ambientales, y por supuesto, estado nutricional y dieta ingerida. Por ejemplo, estos autores describen que durante la primera semana postpartum, los niveles de putrescina permanecen muy bajos mientras las concentraciones de las otras dos poliaminas aumentan considerablemente durante los tres primeros días hasta alcanzar valores 8-10 veces mayores que el primer día postparto.

La concentración de poliaminas en los preparados para lactantes son menores que las de la leche humana. Buts et al, (1995) estiman alrededor de 10 veces menos la cantidad de poliaminas en fórmulas para lactantes en polvo. Más aún, Capano et al (1998), sugieren que sólo la leche humana, y no la leche de vaca ni las fórmulas infantiles, contiene suficientes poliaminas para prevenir la inhibición del desarrollo celular intestinal en un modelo celular donde está inhibida la síntesis de poliaminas.

Papel biológico de las poliaminas de la leche humana

Como hemos señalado anteriormente, las poliaminas son buenos marcadores del desarrollo y la proliferación de la mucosa intestinal y páncreas. A pesar de ello, su acción sobre el crecimiento, desarrollo y la permeabilidad intestinal no es del todo conocida y suscita controversia. Sin embargo, las investigaciones realizadas parecen indicar que las poliaminas son necesarias para el desarrollo intestinal, y más concretamente, pueden ejercer efectos tróficos directos sobre las células intestinales inmaduras, mejorando la permeabilidad de la mucosa. Buts et al (1993), consiguieron mediante administración oral de poliaminas a ratas recién nacidas prematuras una maduración intestinal prematura. Ter Steege et al (1997), mediante administración oral de espermina en ratones recién nacidos, obtienen paralelamente a una maduración bioquímica, una maduración del sistema inmune intestinal, afec-

Breast milk polyamines biological function

As stated, polyamines are good indicators of the development and proliferation of the intestine and pancreas mucosa. Despite this, the effect they have on intestinal growth, development and permeability is not yet well defined and gives rise to some disagreement. However, much research seems to indicate that polyamines are necessary for intestinal development, and more specifically, they may have direct trophic effects on immature intestinal cells, improving mucosa permeability. When orally administering newborn rats with polyamine, Buts et al (1993) observed a maturing of the intestinal immune system. Ter Steege et al (1997) obtained a biochemical maturity and, at the same time, an intestinal immune system maturity by making newborn mice ingest spermine orally. This experiment particularly affected the differentiation of the intraepithelial lymphocyte population. Positive results have been obtained in *in vitro* research (Capano et al, 1998). However, the deprivation of gastrointestinal polyamines in deficient diets, and the bacteria inhibition of polyamine synthesis with orally taken antibiotics, causes a significant hypoplasia in small intestine and colonic mucosa, making it evident the important role they play in intestinal development (Loser et al, 1999).

Another important issue in the biological breast milk activity of polyamines is their possible function as preventive agents of food allergies. A deficient ingestion of polyamines could have a direct effect on the induction of a sensitising effect concerning diet allergens. Research carried out in humans indicates that there is an individual variability of the concentration of polyamines in breast milk coming from different mothers owing to genetic, dietary and life style factors. The probability of a child developing a food allergy can be as high as 80% if the average concentration of spermine in the milk is lower than 2 nmol/ml, and as low as 0%, if the concentration of spermine is higher than 13 nmol/ml. It is also important to stress that spermine increases lymphocyte proliferation and differentiation. (Dandrifosse et al, 2000).

tando particularmente a la diferenciación de la población linfocitaria intraepitelial. Resultados positivos se han obtenido también en ensayos *in vitro* (Capano et al, 1998). Opuestamente, la privación de poliaminas gastrointestinales mediante dietas deficientes en las mismas y la inhibición de la síntesis de poliaminas por bacterias mediante antibióticos orales, conduce a una significativa hipoplasia del intestino delgado y mucosa colónica, evidenciando su importante papel como factores esenciales en el desarrollo intestinal (Loser et al, 1999).

Otro capítulo importante de la actividad biológica de las poliaminas de la leche materna es su posible papel como agentes preventivos de la alergia alimentaria. Una ingesta deficiente de poliaminas podrían jugar un papel en la inducción de la sensibilización a alérgenos de la dieta. Estudios en humanos indican que existe una variabilidad individual de la concentración de poliaminas en la leche de las distintas madres debido a factores genéticos, dietéticos y de estilos de vida. En base a esto, la probabilidad de desarrollar alergia alimentaria por el niño puede llegar al 80% si la concentración media de espermina en leche es menor de 2 nmol/ml, y, 0% si la concentración de la misma es mayor de 13 nmol/ml. También se ha observado que la espermina incrementa la proliferación y diferenciación de linfocitos. (Dandriofosse et al, 2000).

HORMONAS, PÉPTIDOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Está claramente establecido que el calostro y la leche humana contienen numerosas hormonas, péptidos biológicamente activos y factores de crecimiento. Estas hormonas tienen influencia en un amplio número de sistemas. Entre estos sistemas se incluyen el sistema hipotalámico-hipofisario (ya que la leche contiene prolactina, somatostatina, oxitocina...), glándula tiroides (ya que la leche contiene hormona estimulante del tiroides, tiroxina y calcitonina), glándulas sexuales (ya que la leche contiene estrógenos y progesterona), y glándulas adrenales y pancreáticas (Koldovsky et al, 1995).

Estos compuestos parecen tener poca influencia en el adulto debido a que la escasa permeabilidad del epitelio intestinal no deja pasar a la mayoría de estos factores. Ahora bien, es impor-

HORMONES, PEPTIDES AND GROWTH FACTORS

It is a fact that colostrum and breast milk contain multiple hormones, bioactive peptides and growth factors. These hormones have direct influence on a wide range of systems. Among these systems effected are: the hypothalamic-hypophyseal system (since milk contains prolactin, somatostatin, oxitocine, etc.), the thyroid gland (since milk contains the thyroid stimulant hormone, tyrosine and calcitonin), the sexual glands (since milk contains estrogens and progesterone), and the pancreatic and adrenal glands (Koldovsky et al, 1995).

These compounds seem to have a low influence on adults because the limited permeability of the intestine epithelium inhibits the actions of most of the factors. However, it is important to state that the high intestinal permeability related to these pathologies, when these compounds are administered to patients suffering from an intestine condition (for example, Crohn's disease), may allow these compounds to reach their receptors and, therefore, exert their physiological effects. Newborn children, unlike healthy adults, quickly absorb these peptides since their gastrointestinal tract is more permeable. In addition, the resistance offered by these peptides and hormones against the proteolytic action of the gastrointestinal tract, (an essential condition to take effect), is larger and stronger than the resistance offered by these peptides in adults. Therefore, these compounds seem to play a functional role in newborn children (Playford et al, 2000). Numerous researches have been carried out to demonstrate the positive effect of all these compounds on the development and immunity of newborn children. We pay special interest to the presence of these bioactive substances in breast milk due to the fact that these are practically absent in almost every infant formula.

Extensive research (mainly in cellular and animal models) proves the possible activities of these compounds within newborn children fed with breast milk. Some of these effects are:

— The *Epidermal Growth Factor (EGF)* could collaborate in the regulation of hepatic and intestinal development. The oral ingestion of EGF causes an increase of DNA synthesis, RNA transcription, and as a consequence, an increase of protein synthesis, as well stimulating the trans-

tante destacar que cuando estos compuestos son administrados a pacientes con afecciones intestinales (ej. Enfermedad celiaca o de Crohn) la mayor permeabilidad intestinal asociada a estas patologías podría permitir que estos compuestos alcanzaran sus receptores y ejercer sus efectos fisiológicos. En los recién nacidos, al contrario que los adultos sanos, estos péptidos pueden penetrar debido a la mayor permeabilidad del tracto gastrointestinal. Además, la resistencia de estos péptidos y hormonas a la acción proteolítica del tracto gastrointestinal, que es condición indispensable para su acción, es grande y mucho mayor que en adultos. Por tanto, en recién nacidos estos compuestos parecen tener un papel funcional (Playford et al, 2000). Se han llevado cabo numerosos estudios para evidenciar el efecto beneficioso de todos estos compuestos en el desarrollo y estado inmunitario del recién nacido. El interés por la presencia de todas estas sustancias biológicamente activas en la leche de mujer viene reforzado por su ausencia casi general en los preparados para lactantes.

Se han realizado numerosos estudios (prácticamente todos en modelos celulares y animales) que muestran posibles actividades de estos compuestos ejercerían en el recién nacido alimentado con leche materna. Entre estos efectos podemos destacar:

— El *factor de crecimiento epidérmico (EGF)* podría participar en la regulación del desarrollo hepático e intestinal. Ingestas orales de EGF producen un aumento de síntesis de DNA, transcripción de RNA y como consecuencia, un aumento de la síntesis proteica, así como una estimulación del transporte de glucosa, agua y electrolitos (Playford et al, 2000; Bohles et al, 1998) y podría jugar un papel en la prevención del fenómeno de la traslocación bacteriana (Okuyama H et al, 1998).

— El *factor α transformador del crecimiento (TGF- α)* que, de acuerdo con la mayoría de los trabajos, su papel fisiológico más manteniendo el normal funcionamiento de la misma (Playford et al, 2000).

— El *factor β transformador del crecimiento (TGF- β)*, que parece estar implicado en numerosos procesos como desarrollo y diferenciación del epitelio intestinal, crecimiento, carcinogénesis y regulación de la respuesta inmune (Playford et al, 2000). Respecto a esta última, tiene un efecto crucial en dos partes esenciales del

port of glucose, water, and electrolytes (Playford et al, 2000; Bohles et al, 1998), and it may play an important role in the prevention of the bacterial translocation (Okuyama H et al, 1998).

— The *Transforming Growth Factor α (TGF- α)*, which, according to most of the research, has an important physiological role maintaining regular functionality (Playford et al, 2000).

— The *Transforming Growth Factor β (TGF- β)*, implicated in numerous processes, such as the development and differentiation of the intestinal epithelium; the growth, carcinogenesis and regulation of the immune response system (Playford et al, 2000). With respect to the immune system, it has an essential effect in two important parts of the intestinal mucus immune system: e.g., a production and induction of oral tolerance (Kalliomaki M et al, 2000).

— The *Insulin Growth Factor I and II (IGF-I, IGF-II)*, expressed in large amounts in the stomach and the fetal intestine, reaches its highest level after birth. It seems to promote cellular proliferation and differentiation (Playford et al, 2000).

— *Growth Hormone (GH)* is present in the colostrum and in breast milk and bovine milk. It has an important effect on intestine development and functionality (Playford et al, 2000).

— *Neuropeptides*, such as: neurotensine, P substance, somatostatin, and vasoactive peptide. These seem to enhance the immune response by increasing the production of IgA (vasoactive peptide), stimulating T cells, activating macrophages and producing IL-12 by P substance (Goldman et al, 2000).

OLIGOSACCHARIDES

Breast milk, along with lactose (the most important sugar), contains other carbohydrates, such as nucleotide sugars, glycolipids, glycoproteins, and oligosaccharides (Table 3). These substances constitute the third milk component and they have been of great interest to researchers. Breast milk contains 12 g/litre approximately, and there are more than 100 different structures corresponding to different oligosaccharides. Breast milk shows oligosaccharides complexity and variability not found in other types of milks. Breast milk oligosaccharides consist of a reductor end with a lactose molecule and

sistema inmune de la mucosa intestinal: producción de Ig A e inducción de la tolerancia oral (Kalliomaki M et al, 2000).

— *Factores de crecimiento insulínicos tipo I y II (IGF-I, IGF-II)*, expresados en grandes cantidades en el estómago e intestino fetal y alcanzando el máximo tras el nacimiento. Parecen promover la proliferación y diferenciación celular (Playford et al, 2000).

— *Hormona del crecimiento (GH)*, presente en calostro y leche humana y bovina. Parece ejercer un importante papel en el desarrollo y función intestinal (Playford et al, 2000).

— *Neuropéptidos*, como la neurotensina, sustancia P, somatostatina, péptido vasoactivo. Parecen potenciar la respuesta inmunitaria mediante el incremento de producción de IgA (péptido vasoactivo), estimulación de células T, activación de macrófagos y producción de IL-12 por estos últimos (sustancia P) (Goldman et al, 2000).

OLIGOSACÁRIDOS

Junto a la lactosa, que es el azúcar más importante, la leche humana contiene otros carbohidratos como azúcares de nucleótidos, glicolípidos, glicoproteínas y oligosacáridos (Tabla 3).

another non-reductor end with the presence or absence of sialic acid and fucose (Newburg et al, 1995). These seem to resist against enzymatic hydrolysis of the gastrointestinal tract, as is proved by *in vitro* digestions with enzymatic preparations of human and pig pancreas and intestinal membranes (Engfer et al, 2000).

Breast milk oligosaccharides biological function

The interest showed by researchers for oligosaccharides started two years ago after observing that these could be bifidogenic flora promoters in breast milk feeding children. Since these oligosaccharides are not digested in the gastrointestinal tract, they constitute the “soluble fibre” of breast milk, in a way that they provide substrate for all bacteria in the colon of the child still fed with breast milk, contributing, therefore, to an increase in the pH and flora differences between breastfed children and those fed infant formulae (McVeagh et al, 1997). There is currently a great interest in the role of these oligosaccharides as pathogen receptors. The fact that they are synthesized by the glycosyl transferase participating in the glycoproteins and glycolipids synthesis from the intestinal cell surface makes possible the existence of simila-

TABLA III. Oligosacáridos presentes en la leche humana como receptores de microorganismos.

Receptores	Microorganismo
Glicoproteínas conteniendo manosa	<i>Escherichia coli</i> (tipo 1 Fimbrae)
Oligosacáridos fucosilados	<i>E. coli</i> (enterotoxina estable a t ^a)
Tetra y pentasacáridos fucosilados	<i>E. coli</i>
Sialil (α 2-3)lactosa y glicoproteínas	<i>E. coli</i> (S-fimbriae)
Sialil (α 2-3)galactosidos y mucinas	<i>E. coli</i> (S-fimbriae)
Oligosacáridos neutros	<i>Sreptococcus pneumoniae</i>
Fuc α 1-2 Gal epitopes	<i>Candida albicans</i>
Gal (β 1-4) GlcNAc o	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gal (β 1-3)GlcNAc	
Sialil lactosa	<i>Campylobacter pylori</i>
Sialil lactosa	<i>Streptococcus sanguis</i>
Sialil lactosa y glicoproteínas	<i>Campylobacter pylori</i>
Glicoproteínas sializadas (α 2-3)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Poli-N- acetilactosaminas	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
(α 2-3)poly-N-acetilactosaminoglicanos	<i>Streptococcus suis</i>
Sialil (α 2-3)lactosa	<i>Influenza virus A</i>
Sialil (α 2-3)lactosa	<i>Influenza virus B</i>
9-O-Ac de NeuAc (α 2-3)R	<i>Influenza virus C</i>

Tomado de Kunz et al (1993)

TABLA III. Oligosaccharides present in breastmilk as microorganisms receptors.

Receptors	Microorganism
Glycoproteins containing mannose	Escherichia coli (tipo 1 Fimbrae)
Fucosylated Oligosaccharides	E.coli (enterotoxina stable a [†])
Fucosylated Tetra and pentasaccharides	E. coli
Sialyl (α 2-3)lactose and glycoproteins	E. coli (S-fimbriae)
Sialyl (α 2-3)galactosides and mucins	E. coli (S-fimbriae)
Neutral Oligosaccharides	Sreptococcus pneumoniae
Fuc α 1-2 Gal epitopes	Candida Albicans
Gal (β 1-4) GlcNAc o	Pseudomonas aeruginosa
Gal (β 1-3)GlcNAc	
Sialyl lactose	Campylobacter pylori
Sialyl lactose	Streptococcus sanguis
Sialyl lactose and glycoproteins	Campylobacter pylori
Sylated Glycoproteins (α 2-3)	Mycoplasma pneumoniae
Poly-N- acetyllactosamines	Mycoplasma pneumoniae
(α 2-3)poly-N-acetyllactosamineglicanes	Streptococcus suis
Sialyl (α 2-3)lactose	Influenza virus A
Sialyl (α 2-3)lactose	Influenza virus B
9-O-Ac - NeuAc (α 2-3)R	Influenza virus C

Kunz et al (1993)

Estos últimos constituyen el tercer componente de la leche y han tomado actualmente un gran interés para los investigadores. Se calcula que la leche madura contiene alrededor de 12 g/litro, habiéndose identificado más de 100 estructuras distintas correspondientes a distintos oligosacáridos. La leche humana muestra una complejidad y variabilidad de oligosacáridos no encontrada en la leche de otras especies. Los oligosacáridos de la leche materna constan de un extremo reductor con una molécula de lactosa y otro extremo no reductor con la presencia o no de ácido siálico y fucosa (Newburg et al, 1995). Parecen ser resistentes a la hidrólisis enzimática del tracto gastrointestinal, como se comprueba mediante digestiones in vitro con preparaciones enzimáticas de páncreas humano y porcino y membranas intestinales (Engfer et al, 2000).

Papel biológico de los oligosacáridos de la leche humana

El interés de los investigadores por los oligosacáridos comenzó hace años con la observación de que podrían ser promotores de la flora bifidogénica en los niños alimentados al pecho. Al no ser digeridos en el tracto gastrointestinal, constituyen la "fibra soluble" de la leche materna de forma que proveen sustratos para las bacterias del colon del lactante, contribuyendo así a las

rities between carbohydrates on the surface epithelial cells and oligosaccharides. This fact reinforces the hypothesis that oligosaccharides may act as equivalents or analogous of cellular receptors for pathogenic micro organisms, producing specific interactions between these oligosaccharides and pathogens and acting, in this way, as intestinal mucosa cell protectors acting against pathogens. They may constitute an additional defence mechanism for newborn children, whose gastric pH is less acidic than in adults, and whose immunity system is not yet mature. In fact, amongst breastfed children there is a lower rate of children suffering from diarrhoea, respiratory diseases and otitis (Newburg et al, 1995; Kunz et al, 2000). Several examples prove this fact: inhibition of the toxic effect of the Escherichia coli stable toxin, inhibition of the infection caused by Campylobacter jejuni, blocking of the union of Streptococcus pneumoniae and enteropathogenic Escherichia coli with their respective receptors (Newburg, 1999).

Moreover, breast milk oligosaccharides might play a relevant role as sialic acid suppliers, which are essential for the neural development of the child still feeding on milk. Therefore, Sánchez-Díaz et al, (1997), have found less total sialic acid and oligosaccharides in those children fed infant formulae than in those breastfed.

diferencias en el pH y flora que existen entre los niños alimentados al pecho y con fórmula (McVeagh et al, 1997). En la actualidad el interés está centrado en su papel como receptores de patógenos. El hecho de que sean sintetizados por las mismas glicosiltransferasas que participan en la síntesis de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de las células intestinales, hace que existan similitudes entre los carbohidratos de la superficie de las células epiteliales y los oligosacáridos. Esto apoya la hipótesis de que estos últimos actuarían como homólogos o análogos de los receptores celulares para microorganismos patógenos, produciéndose interacciones específicas entre estos oligosacáridos y patógenos y actuando de esta forma como protectores de las células de la mucosa intestinal al ataque de los patógenos. Constituirían un mecanismo de defensa adicional para los recién nacidos, cuyo pH gástrico es menos ácido que en el adulto y cuyo sistema inmunitario no está todavía maduro. De hecho, los niños alimentados al pecho muestran menores tasas de diarrea, enfermedades respiratorias y otitis media (Newburg et al, 1995; Kunz et al, 2000). Varios ejemplos se han descrito: inhibición del efecto tóxico de la toxina estable de *Escherichia coli*, inhibición de la infección por *Campylobacter jejuni*, bloqueo de la unión de *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli* enteropatógena con sus respectivos receptores (Newburg, 1999).

Además de lo anterior, los oligosacáridos de la leche materna podrían desempeñar un importante papel como suministradores de ácido siálico, esencial para el desarrollo cerebral del lactante. Así, Sánchez-Díaz et al, (1997), han encontrado valores de ácido siálico total y oligosacáridos menores en niños alimentados con fórmulas de iniciación que aquellos alimentados con leche materna. Concretamente un 36 y 28% respectivamente de los valores de niños alimentados al pecho.

Es importante destacar que las madres lactantes se diferencian genéticamente en su capacidad para producir oligosacáridos, y esto podría influir de manera importante en la susceptibilidad de los recién nacidos alimentados al pecho a las infecciones intestinales.

En base a todo esto, la influencia de la suplementación de los preparados para lactantes con oligosacáridos en la susceptibilidad de los recién nacidos a las enfermedades del tracto gastrointestinal, por ejemplo diarrea aguda, es uno de los campos actuales de investigación.

Specifically, 36% and 28%, respectively, of the values for breastfed children.

It is important to state that all mothers during the pre-weaning period are genetically different in their ability to produce oligosaccharides, and this could have an important influence on the sensitivity of newborn breastfed children to intestinal infections.

Based on this information, concerning the influence of the addition of oligosaccharides to infant formulae on children still feeding on a milk diet, the sensitivity to gastrointestinal tract diseases in newborn children, acute diarrhoea for example, is one of the current fields of research.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Andersson Y., Lind S., Lagerqvist C., Hernell O. (2000). Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum Dev*; 50:95-105.
- Bohles H., Gebhardt C., Beeg T. (1998). Reflections about possible nutritional supplements in infant milk formula. *Z Ernährungswiss*; 37:132-146.
- Boza J.J., Jiménez J., Faus M.J., Gil A. (1992). Influences of postnatal age and dietary nucleotides on plasma fatty acid in the weanling rat. *JPEN*; 16:322-326.
- Brines R.D., Brock J.H. (1983). The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum. Unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim Biophys Acta*; 759:229-235.
- Buts J.P., De Keyser N., Kolanowski J., Sokal E., Nsegiyumba T. (1993). Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine: role of dietary polyamines. *Dig Dis Sci*; 38:1091-1098.
- Buts J.P., De Keyser N., De Raedemaeker L., Collette E., Sokal E.M. (1995). Polyamine profiles in human milk, infant artificial formulas, and semi-elemental diets. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 21(1): 44-49.
- Capano G., Bloch K.J., Carter E.A., Dascoli J.A., Schoenfeld D., Harmatz P.R. (1998). Polyamines in human and rat milk influence intestinal cell growth in vitro. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 27:281-286.
- Carver J.D., Pimentel B., Cox W.I., Barness L.A. (1991). Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics*; 88: 359-363.
- Carver J.D. (1996). Nucleótidos. *Anales Nestlé*; 54: 99-109.
- Dandrifosse G., Peulen O., El Khefif N., Deloyer P., Dandrifosse A.C., Grandfils C. (2000). Are milk polyamines preventive agents against food allergy?. *Proc Nutr Soc*; 59(1):81-86
- Davidson L.A., Lonnerdal B. (1987). Persistence on human milk proteins in the breast fed infant. *Acta Paediatr Scand*; 76:733-740.
- Engfer M.B., Stahl B., Finke B., Sawatzki G., Daniel H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*; 71:1589-1596.
- Fransson G.B., Lonnerdal B. (1980). Iron in human milk. *J Pediatr*; 96:380-384.
- George, D.E., DeFrancesca, B.A. (1989). Human milk in comparison to cow milk. En: Leberthal, E. (ed). *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*, 2th edn. Raven Press, New York, pp. 239-260.
- Gil, A., Uauy, R. (1995). Nucleotides and related compounds in human and bovine milks. En: Jensen, R.G. (ed). *Handbook in milk composition*, Academic Press, New York, pp. 436-464.
- Goldman A.S. (2000). Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. *Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. J Nutrition*; 130:426S-431S
- Hutchens T.W., Henry J.F., Yip T.T. (1991). Origin of intact lactoferrin and its ADN-binding fragments found in the urine of human -milk preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr Res*; 29:243-50.
- Jiménez J., Boza J.J., Suárez M.D., Gil A. (1992). Changes in fatty acid profiles of red blood cell membranes mediated by dietary nucleotides in weanling rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 14:293-9.
- Kalliomaki M., Ouwehand A., Arvilommi H., Kero P., Isolauri E. (1999). Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol*; 104(6): 1251-1257.
- Koldovsky, O., Strbak, V. (1995). Hormones and growth factors in human milk. En: Jensen, R.G. (ed). *Handbook in milk composition*, Academic press, New York, pp. 436-464.
- Kunz C., Rudloff S. (1993). Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr*; 88:903-912.
- Kunz C., Rudloff S., Baier W., Klein N., Strobel S. (2000). Oligosaccharidos in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr*; 20:699-722.
- Kuwata H., Yip T.T., Tomita M., Hutchens T.W. (1998). Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*; 1429(1): 129-141.
- Lonnerdal B., Forsum E., Hambreus L. (1976). A longitudinal study of the protein, nitrogen and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers. *Am J Clin Nutr*; 29: 1127-33.
- Lonnerdal B. (1997). Lactoferrina. *Anales Nestlé*; 54(3): 89-98.
- Loser C., Eisel A., Harms D., Folsch U.R. (1999). Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut*; 44:12-16.
- Marcheti E. (1998). Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of Herpes simplex virus type 1 and 2. *Biomaterials*; 11:89-94.
- Martínez-Valverde, A., Ramírez, M., Sánchez-Pozo, A., Gil, A. (1996). Effect of dietary nucleotides on the polyunsaturated fatty acid metabolism in low birth weight neonates. En Gil, A., Uauy, R. (eds). *Nutritional and biological significance of dietary nucleotides and nucleic acids*. Abbott Laboratories, Granada, pp:121-132.
- McVeagh P., Miller J.B. (1997). Human milk oligosaccharides: only the breast. *J Paediatr Child Health*; 33:281-286.
- Naidu, A.S., Arnold, R.R. (1997). Influence of lactoferrin on host-microbe interactions. En: Hutchens, T.W., Lonnerdal B. (eds). *Lactoferrin: interaction and biological functions*, Humana Press, pp. 259-275.
- Newburg, S.N., Neubauer, S.H. (1995). Carbohydrates in milk: analysis, quantities, and significance. En: Jensen, R.G. (ed). *Handbook in milk composition*, Academic press, New York, pp. 273-350.
- Newburg S.N. (1999). Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr Med Chem* ; 6:117-127.

- Nichols B.L., McKee K.S., Henry J.F., Putman M. (1987). Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into ADN of rat crypt cells. *Pediatr Res*; 21:563-567.
- Okuyama H., Urao M., Lee D., Drongowski R.A., Coran A.G., (1998). The effect of epidermal growth factor on bacterial translocation in newborn rabbits. *J Pediatr Surg*; 33:225-228.
- Playford R.J., Macdonald C.E., Johnson S. (2000). Colostrum and milk-derived peptide growth for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr*;72:5-14.
- Saarinen U.M., Siimes M.A., Dallman P.R. (1977). Iron absorption in infant: 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*; 91:36-39.
- Sánchez-Díaz A., Ruano M.J., Lorente F., Hueso P. (1997). A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 24:405-410.
- Tanaka M., Lee K., Martinez-Augustin O., He Y., Sanderson I.A., Walker W. (1996). Exogenous nucleotides alter the proliferation, differentiation and apoptosis of human small intestinal epithelium. *J Nutrition*; 126: 424-433.
- Ter Steege C.A., Buurman W.A., Forget P.P. (1997). Spermine induces maturation of the immature intestinal immune system in neonatal mice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 25(3):332-340
- Tsujinaka T., Iijima S., Kido Y. (1993). Role of nucleosides and nucleotide mixture in intestinal mucosal growth under total parenteral nutrition. *Nutrition*; 9:532-535.
- Uauy, R. Dietary nucleotides and requirements in early life. (1989).En: Lebenthal ed. Textbook of gastroenterology and nutrition, Raven Press, New York, pp. 265-280.
- Uauy R., Stringel G., Thomas R., Quan R. (1990). Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 10:497-503.