



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de los niveles de IgA1 e IgA2 en calostro humano por efecto de la vacunación en contra de *Streptococcus pneumoniae* durante la gestación

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
C. JOSUE ZAMBRANO CARRASCO

DIRECTOR: DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO

Agosto 2020



AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo incondicional de mis padres y abuelos por permitirme realizar mis estudios universitarios en México y en el extranjero, al igual por apoyarme en mis actividades científicas extracurriculares. Gracias infinitamente por confiar en mí, se los voy a retribuir. Al resto de mi familia, agradezco que de una forma directa o indirecta me apoyaron a culminar este logro.

A mis amigos que conocí en la preparatoria, la universidad y en Chile, por el apoyo mutuo en el ámbito académico y personal. Gracias por impulsarme a ser mejor en cada lugar que estoy y en cualquier aspecto.

Un agradecimiento especial al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Zacatenco y desarrollarme ese ambiente de tan alto nivel, por brindarme su experiencia y sabiduría en el mundo científico, por su retroalimentación y tiempo para este trabajo.

Al Mtro. Erick Sánchez Salguero por su asesoría, paciencia, tiempo y enseñanza durante mi estadía en el CINVESTAV y posterior a ella.

Al Dr. Héctor Romero Ramírez por el apoyo en el aspecto técnico de este trabajo.

A mis profesores, por brindarme sus conocimientos y experiencia, en especial a la Dra. Vianney Marín Cebada y a la Dra. Fabiola Avelino Flores, por su consejo, asesoría y enseñanza.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por todas las oportunidades que me brindó durante los 5 años como universitario, por ofrecerme profesores de calidad y por ser una universidad tan consiente de su población estudiantil.

Este proyecto contó con el apoyo económico del CONACYT, a través del financiamiento del proyecto PDCPN 2015/900: "Detección de inmunoglobulina A en calostro humano como tamizaje de deficiencia selectiva de IgA en madres y su correlación con infecciones (vías respiratorias y gastrointestinales) en el neonato durante el primer trimestre de vida", otorgado al Dr. Leopoldo Santos Argumedo.

Índice

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Lactancia materna	7
2.1.1 Importancia de la lactancia materna para el infante	7
2.1.1.1 Protección en contra de enfermedades infecciosas	7
2.1.1.2 Prevención de alergias	8
2.1.1.3 Selección de la microbiota	9
2.1.1.4 Prevención de enfermedades crónicas.....	9
2.1.1.5 Beneficios para el desarrollo cognitivo	11
2.2 Calostro	11
2.2.1 Componentes inmunológicamente activos.....	12
2.2.1.1 Citocinas	12
2.2.1.2 Inmunoglobulinas.....	13
2.2.1.3 Factores antimicrobianos y moléculas multifuncionales de respuesta innata 13	
2.2.1.4 Oligosacáridos	14
2.2.1.5 Lípidos	15
2.2.1.6 Células del sistema inmune	15
2.2.2 Inmunoglobulina A (IgA) en calostro	15

2.2.2.2	Características y función de IgA1 e IgA2 en calostro	16
2.2.2.3	Reconocimiento de IgA en calostro	16
2.3	Impacto de la vacunación en el calostro	17
2.4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	17
2.4.1	Características microbiológicas.....	17
2.4.2	Relevancia médica y epidemiología	18
2.4.3	Polisacáridos capsulares.....	20
2.4.4	Vacunación en contra de <i>S. pneumoniae</i>	22
2.4.4.2	Vacuna de polisacáridos capsulares (PPV-23).....	23
2.4.4.3	Vacunas conjugadas (PCV7, PCV10 y PCV13)	23
2.5	Anticuerpos en calostro contra polisacáridos capsulares de <i>S. pneumoniae</i> 24	
3	JUSTIFICACIÓN	25
4	HIPÓTESIS	25
5	OBJETIVOS	25
5.1	Objetivo general	25
5.2	Objetivos específicos.....	25
6	MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1	Calostros	26
6.2	Suero de referencia	26

6.3	Pulmovax: vacuna de polisacáridos capsulares.....	26
6.4	Análisis experimental.....	26
6.5	Análisis estadístico	28
7	RESULTADOS.....	28
8	DISCUSIÓN	35
9	CONCLUSIÓN	38
10	REFERENCIAS.....	40

1. RESUMEN

La práctica de la lactancia materna es un proceso que beneficia la salud del neonato a corto, mediano y largo plazo, especialmente el suministro de calostro. El calostro, la primera secreción producida por la glándula mamaria durante los primeros 2 a 4 días después del parto, posee un papel fundamental en la protección del recién nacido contra enfermedades transmisibles. El contenido de compuestos inmunológicamente activos en el calostro, tiene un rol primordial en la protección en contra de patógenos a los que se ve expuesto el neonato, especialmente aquellas enfermedades que afectan a la población infantil como las causadas por *Streptococcus pneumoniae*. Uno de los principales componentes inmunológicos del calostro es el contenido de IgA; en sus subtipos, IgA1 e IgA2. Los niveles de los subtipos de IgA pueden verse afectados por varios factores en los que incluye la vacunación durante el periodo de gestación.

En este trabajo se evaluaron los niveles de IgA1 e IgA2 de 113 muestras de calostro procedentes de mujeres del Hospital de la Mujer, el Hospital 1º de Octubre ISSSTE y el Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca mediante la técnica de ELISA cuantitativa. Los datos obtenidos fueron analizados de acuerdo a su estado de vacunación durante el proceso de gestación de la madre con la vacuna de 23 polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*. Además, se analizó el efecto del tipo de parto en conjunto con el estado de vacunación.

Los resultados obtenidos mostraron que la principal subclase presente en los calostros fue IgA2 y que aquellas madres que fueron vacunadas presentaron niveles mayores de esta subclase. Se propuso en este trabajo un mecanismo en el cual la interacción previa con el patógeno y anticuerpos naturales maternos, en conjunto con la vacunación (en mujeres vacunadas), pudieron incrementar los niveles de IgA. El mecanismo toma en consideración el hecho de que IgA2 principalmente reconoce carbohidratos. El efecto del tipo de parto en los niveles totales de IgA1 e IgA2 no fue concluyente. Futuros trabajos en donde se estudie la funcionalidad de los anticuerpos IgA1 e IgA2 procedentes del calostro contra *S. pneumoniae* en neonatos, el efecto del tipo de parto en los niveles de IgA y el mecanismo propuesto

son requeridos para implementar medidas de inmunización durante la gestación y reforzar la práctica de la lactancia después del parto.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Lactancia materna

En México, según el estudio realizado por ENADID en 2014, la práctica de la lactancia materna no es homogénea a lo largo de todo el país; los estados en los cuales se reportan mayores porcentajes de la práctica de la lactancia son: Puebla (95%), Yucatán (95.2%) y Tlaxcala (95.2%), por otro lado, los estados que reportaron los porcentajes más bajos son: Durango (86%), Coahuila (86.2%) y Aguascalientes (87.2%). Además, más del 90% de los hijos nacidos vivos de mujeres de 15 a 39 años recibieron lactancia materna, y las mujeres en ese grupo de edad que viven en comunidades menores a 15 mil habitantes, presentaron los mejores patrones de lactancia materna (Sánchez-Pérez *et al.*, 2019).

2.1.1 Importancia de la lactancia materna para el infante

A través de las prácticas óptimas de lactancia, se han reportado diversos beneficios para el desarrollo y salud del infante, a corto, mediano y largo plazo.

2.1.1.1 Protección en contra de enfermedades infecciosas

Se ha demostrado una protección en contra de enfermedades infecciosas a través de los componentes presentes en el calostro y la leche madura tanto moleculares; como enzimas, oligosacárido y lípidos, y componentes celulares; como macrófagos, neutrófilos y demás células del sistema inmune.

El principal inhibidor del metabolismo de bacterias es la lactoferrina. La lactoferrina inhibe el crecimiento de algunos patógenos, al secuestrar los iones de hierro presentes en el medio (Labbok *et al.*, 2004). Además, el péptido en la posición amino terminal de la lactoferrina posee propiedades antimicrobianas en contra de *Streptococcus mutans* y *Vibrio cholera* (Yamauchi *et al.*, 1993).

La lisozima, una proteína lítica que degrada la pared celular de bacterias, puede poseer un rol en la protección del infante, dado su alta concentración en la leche materna (Labbok *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2002).

Las inmunoglobulinas suministradas mediante la lactancia materna pueden inmovilizar patógenos, evitando su adherencia en las superficies epiteliales, igualmente, actúan neutralizando factores de virulencia o toxinas (Labbok *et al.*, 2004).

La diversidad de oligosacáridos en la leche materna les confiere diferentes funciones (Labbok *et al.*, 2004). Una de las funciones en contra de bacterias y toxinas, es su capacidad de inhibir la unión de patógenos entéricos y respiratorios a las células epiteliales, actuando como análogos de receptores (Goldman *et al.*, 2002). La estructura química del oligosacárido determinará su especificidad de unión hacia las estructuras o toxinas de los patógenos. Por ejemplo, el gangliósido GM1, evita la unión de la toxina de *V. cholera* y *Escherichia coli* (Laegreid & Kolsto-Otnaess, 1987), mientras que la globotriaosilceramida tiene una acción similar en contra de la subunidad B de la toxina Shiga (Newburg *et al.*, 1992).

2.1.1.2 Prevención de alergias

La información sobre la prevención de enfermedades atópicas y alergias es contrastante (Minniti *et al.*, 2014). Por un lado, existe evidencia que algunos componentes, mediante un mecanismo de acción directa, pueden ejercer un papel protector en contra de alergias. Por ejemplo, se ha documentado que algunos antígenos transmitidos por aire pueden ser transferidos al infante por medio de la lactancia, por lo tanto, la leche materna pudiera inducir la tolerancia y prevención de ciertos tipos de alergias (Verhasselt *et al.*, 2008). Mientras que otros trabajos infieren que no existe una acción preventiva en contra del asma (Kramer *et al.*, 2007). Así que su rol protector aún sigue en debate.

Rajani y colaboradores proponen que la actividad protectora en contra del desarrollo de alergias puede estar relacionada con la modulación de la microbiota del infante, por acción individual o conjunta de los componentes biológicamente activos, como inmunoglobulinas, citocinas y oligosacáridos (Rajani *et al.*, 2018).

De acuerdo con un metaanálisis del 2016 sobre trabajos realizados en países de ingresos bajos, medios y altos, no se encontró evidencia clara de la protección de alergias, específicamente en contra de eccema y alergias contra antígenos alimentarios (Victoria *et al.*, 2016). Sin embargo, se encontró protección en contra

de rinitis alérgica en niños menores de 5 años (Lodge *et al.*, 2015). Además, se notó una reducción del 9% del asma a causa de la lactancia, al analizar 29 estudios relacionados a esta enfermedad (Victoria *et al.*, 2016).

2.1.1.3 Selección de la microbiota

Se ha destacado el papel de la microbiota en el mantenimiento de la homeostasis del ser humano; especialmente en el tracto gastrointestinal, y que su alteración, conocida como disbiosis, puede conducir a diferentes enfermedades.

El papel del calostro para la selección de la microbiota del infante, es atribuido a la función de las inmunoglobulinas que contiene el calostro y la leche materna, específicamente por acción de la inmunoglobulina A (IgA), sin embargo, este rol aún se encuentra en investigación (Macpherson & Yilmaz, 2018; Bunker & Bendelac, 2018).

De acuerdo con los descubrimientos de Fadlallah y colaboradores en 2018, la IgA promueve la regulación de la microbiota en el intestino, al determinar las proporciones de cada filum presentes en este sitio anatómico. Evaluando la composición microbiana de las heces de pacientes sanos y pacientes con deficiencia de IgA. Se descubrió que la diversidad bacteriana se mantuvo en ambos casos, sin embargo, las proporciones de 17 especies bacterianas de los filum Firmicutes, Bacteroides y Proteobacteria aumentaron en los pacientes con deficiencia de IgA. Además, las muestras de pacientes carentes de IgA presentaron una unión reducida por parte de otras subclases de inmunoglobulinas, como IgM e IgG al orden de Enterobacteriaceae, este orde de bacterias se encuentra relacionado con trastornos inflamatorios en el intestino.

2.1.1.4 Prevención de enfermedades crónicas

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades crónicas o también conocidas como enfermedades no transmisibles, son el resultado de una serie de factores genéticos, ambientales, fisiológicos y conductuales, que actúan en conjunto. Las principales enfermedades crónicas son: enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades crónico-respiratorias y diabetes.

La lactancia se ha considerado un factor protector en contra de algunas de las enfermedades crónicas, a consecuencia de sus efectos a largo plazo (Klishadi & Faranjan, 2014).

Se ha determinado la influencia de la lactancia a la presión sanguínea, sistólica y diastólica, de personas adultas (Owen *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005). El efecto puede estar dado por el contenido de sodio y ácidos grasos. Se ha propuesto tres mecanismos que explican este efecto a la presión sanguínea, uno de ellos se le atribuye al efecto benéfico proporcionado por el consumo reducido de sodio en la dieta del infante por la leche materna (Fomon, 2001), otro propone que el alto contenido consumido de ácidos grasos insaturados de cadena larga en la leche materna poseen un papel en el sistema coronario endotelial (Forsyth *et al.*, 2003), y finalmente, mediante la protección en contra de la hiperinsulinemia (Axelsson *et al.*, 1989).

Para la protección en contra de la obesidad, se han planteado dos mecanismos biológicos que pueden estar implicados, el primero de ellos es atribuido a patrones conductuales, en los que la lactancia materna mejora el proceso de la alimentación, el cual tiene un efecto en la saciedad y apetito del infante, lo cual puede tener una influencia en las etapas de crecimiento posteriores (Kelishadi & Farajian, 2014). El segundo mecanismo se encuentra relacionadas a un aspecto fisiológico, en el cual, de manera comparativa con las fórmulas lácteas para infantes, la leche materna posee menor cantidad de proteínas y lípidos, por lo tanto, la secreción de factor de crecimiento insulínico tipo 1 es menor y la estimulación de adipocitos se ve disminuida, lo que resulta en la prevención de la obesidad (Stolzer, 2011). Estudios *in vitro* han apoyado esta idea, al comprobar que hormonas presentes en la leche materna, como por ejemplo la leptina, pueden alterar los factores de crecimiento y prevenir la formación de adipocitos (Hauner, Rohrig & Petruschke, 1995; Petruschke, Rohrig & Hauner, 1994). Sin embargo, aún faltan más estudios sobre el tema para asegurar y recalcar una protección en contra de la obesidad.

Varios estudios han comprobado el efecto protector de la lactancia materna en contra de la diabetes mellitus tipo II (Kelishadi & Farajian, 2014). La composición de la leche materna es considerada la responsable de dicho efecto, especialmente la

composición hormonal; de insulina, motilina, introglucagón, neurotensina y pancreatina, las cuales ocasionan la disminución de los depósitos de grasa subcutáneos en infantes alimentados con leche materna (Lucas *et al.*, 1980).

Algunos estudios han propuesto una disminución de los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la edad adulta. Los factores de riesgo en los que la lactancia puede tener un efecto son el nivel de colesterol (Singhal *et al.*, 2004), la hipertensión (Owen *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2004) y la obesidad (Owen *et al.*, 2008). Para establecer una relación precisa se requieren estudios longitudinales para determinar su efecto protector, teniendo en consideración la duración de la lactancia (Kelishadi & Farajian, 2014).

2.1.1.5 Beneficios para el desarrollo cognitivo

Se ha establecido la idea de que la lactancia materna promueve de manera benéfica el desarrollo cognitivo del infante (Labbok *et al.*, 2004). La acción de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, específicamente el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico, son considerados los principales factores para el mecanismo del desarrollo cognitivo, por sus efectos en el sistema visual y en el funcionamiento y desarrollo neuronal (Das & Fams, 2003; Brenna *et al.*, 2007; McCann & Ames, 2005).

Varios metaanálisis han establecido una correlación entre el mejoramiento del desarrollo cognitivo y la lactancia materna (Lee *et al.*, 2016; Anderson, Johnstone & Remley, 1999), mientras que otros establecen lo contrario, reportando una relación débil o inexistente (Girard *et al.*, 2017). Lee y colaboradores en 2016, establecieron una correlación positiva entre el desarrollo cognitivo y la duración de la lactancia, reportando que aquellos infantes amamantados por más de 9 meses tuvieron un desarrollo cognitivo significativamente mejor en comparación de los infantes que no recibieron lactancia materna.

2.2 Calostro

El calostro es considerado como la primera secreción de la glándula mamaria después del parto. La producción de calostro tiene una duración de 2 a 4 días (Godhia & Patel, 2013). Presenta componentes cruciales para mantenimiento de la

homeostasis del infante al apoyar su sistema inmune, ya que posee inmunoglobulinas, factores de crecimiento, citocinas, factores antimicrobianos y células inmunes (Rajani *et al.*, 2018; Bardanzellu *et al.*, 2017). Por sus componentes y su respectiva actividad en el infante, la función primaria del calostro es inmunológica (Ballard & Morrow, 2013).

La leche materna es un fluido altamente dinámico, que cambia su composición durante la lactancia para satisfacer las necesidades de cada etapa del desarrollo del infante. Se definen tres fases distintas de la leche materna: calostro, leche de transición y leche madura (Figura 1) (Ballard & Morrow, 2013; Morera-Pons *et al.*, 2000).



Figura 1. Etapas de la leche materna. Se muestran los días a los que se presenta cada tipo de leche materna después del parto, al igual que los principales componentes que caracterizan a cada fase.

2.2.1 Componentes inmunológicamente activos

2.2.1.1 Citocinas

Las citocinas son proteínas involucradas en la modulación de la inflamación aguda y crónica, su acción es mediante una red de interacciones que es compleja y a veces considerada como contradictoria. Dentro del grupo de las citocinas, se encuentran las quimiocinas, las cuales tienen una función en el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección o daño (Turner *et al.*, 2014).

En la leche materna, las citocinas y quimiocinas difieren sus concentraciones entre madres, además, la mayoría de las citocinas se encuentran en bajas cantidades, lo

que pone en debate su actividad biológica en el recién nacido (Rajani *et al.*, 2018). Las citocinas y quimiocinas en leche materna poseen un perfil que promueven la inflamación o protegen en contra de infecciones (IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α), y las que poseen una función antiinflamatoria (TGF- β , IL-10, MIF) (Ballard & Morrow, 2013). Un ejemplo de una citocina que se encuentra en niveles biológicamente relevantes es la familia TGF- β (factor de crecimiento transformante β). Se han reportado 3 isoformas de TGF- β , siendo la isoforma TGF- β 2 la más abundante en leche materna (Kalliomaki *et al.*, 1999; Ballard & Morrow, 2013). TGF- β se vuelve biológicamente activa después del tratamiento ácido, proporcionado por el bajo pH del estómago (Nakamura *et al.*, 2009). Dentro de las funciones de TGF- β son la supresión de las rutas Th1 y Th2, influyen en el desarrollo y maduración del sistema inmune en mucosas de ratones neonatos, y está asociado con protección en contra del asma.

2.2.1.2 Inmunoglobulinas

El principal isotipo de inmunoglobulina presente en calostro humano es IgA, representando 17.35 mg/ml, con una notable diferencia con IgG e IgM, los cuales representan 0.43 mg/ml y 1.59 mg/ml, respectivamente (Stelwagen *et al.*, 2014). A diferencia de otras especies de mamíferos, el calostro y la leche materna poseen un bajo contenido de IgG. Se considera que este efecto es causado por la transferencia de IgG por vía placentaria en humanos; lo que refleja adaptaciones reproductivas y el nivel de desarrollo de la descendencia después del parto (Hurley & Theil, 2011).

2.2.1.3 Factores antimicrobianos y moléculas multifuncionales de respuesta innata

Un conjunto de proteínas relacionadas con funciones en la respuesta inmune de tipo innata se encuentra en el calostro y leche materna. Típicamente, estas moléculas se encuentran en altas cantidades en el calostro y van disminuyendo a medida que continúa el proceso de la lactancia (Ballard & Morrow, 2013).

Entre los principales factores antimicrobianos presentes en calostro se encuentra la lactoferrina, una glicoproteína que se une al ion férrico y que representa alrededor de 700 mg/ml en el calostro humano (Stelwagen *et al.*, 2009). La lactoferrina tiene

una actividad en contra de virus, bacterias, hongos y protozoarios (Orsi, 2004). Otra glicoproteína con función inmunológica es la lactoadherina o Mfg8 (del inglés 'fat globule-EDF factor 8 protein'). La lactoadherina presente en la leche materna resiste el paso por el estómago (Peterson *et al.*, 1998). Algunas de sus funciones son la prevención de infecciones por rotavirus en neonatos (Newburg, 1998); la lactoadherina promueve la toma de restos apoptóticos por células fagocíticas después de de una infección o daño en el hospedero (Aziz *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2004), además, estimula cascadas de señalización mediante el bloqueo del TLR-4 y el factor nuclear κ B, lo que resulta en la disminución de la inflamación (Aziz *et al.*, 2011; Kusunoki *et al.*, 2012); en el intestino la lactoadherina promueve la recuperación durante el proceso de inflamación intestinal (Kusunoki *et al.*, 2015; Chogle *et al.*, 2011), y el desarrollo de un fenotipo tolerogénico en células dendríticas y macrófagos intestinales (Aziz *et al.*, 2011; Baghdadi *et al.*, 2012).

La lisozima de la leche humana es una enzima que degrada la pared celular de bacterias Gram positivas, al romper los enlaces glicosídicos del ácido N-acetil murámico con la molécula del peptidoglicano (Chipman & Sharon, 1969). La lisozima en la leche materna se encuentra en una cantidad 300 veces más alta que en la leche de las vacas (Goldman, Chheda & Keeney, 2000), esta gran cantidad compensa la baja producción de proteínas en mucosas durante la infancia (Boat *et al.*, 1977).

2.2.1.4 Oligosacáridos

Los oligosacáridos presentes en la leche materna (HMO, por sus siglas en inglés) están compuestos por un rango de 3 a 32 monosacáridos (Newburg, Ruiz-Palacios & Morrow, 2005). Estos azúcares no son digeribles por el infante, sin embargo, su principal función es proveer el sustrato necesario para la microbiota intestinal del infante, particularmente de bifidobacterias y Bacteroides (Sela *et al.*, 2008; Turrioni *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013).

Otras de las funciones de los HMO son la actividad antiinflamatoria (He *et al.*, 2014). Algunos HMO tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las células intestinales (Kuntz, Kunz & Rudloff, 2009), mientras que otros se unen a células dendríticas a través del receptor de lectina DC-SIGN, lo que inhibe la transferencia de virus del

VIH a linfocitos T (Naarding *et al.*, 2005). Además, se ha estudiado su función como receptores análogos que se unen a bacterias entéricas y respiratorias, al igual que toxinas (Goldman *et al.*, 2002).

Entre madres lactantes existen variaciones en la composición y cantidad de HMO, a consecuencia de los diferentes grupos sanguíneos y el estatus secretor, dado que los genes FUT2 y FUT3 están implicados (Rajani *et al.*, 2018)

2.2.1.5 Lípidos

La leche materna posee una cantidad de lípidos que van desde 3.2 a 3.6 g/dL, de madres en las que el embarazo llegó a término (Ballard & Morrow, 2013); los triacilglicéridos representan el 98% del total de lípidos en la leche materna (Jensen *et al.*, 1995). Estos lípidos presentes en la leche materna son altamente diversos y varía su cantidad de acuerdo con el seno que alimenta al infante y la etapa de la leche materna (Morera-Pons *et al.*, 2000).

Algunos ácidos grasos y monoglicéridos producidos del proceso de digestión enzimática de triacilglicéridos poseen capacidad antiviral, mediante la disrupción de virus envueltos (Isaac, 2001).

2.2.1.6 Células del sistema inmune

La leche materna contiene linfocitos, macrófagos y células madre (Jarvinen & Soumalainen, 2002; Indumathi *et al.*, 2013). En especial, el calostro puede suministrar 10^{10} leucocitos al día, sin embargo, sus funciones son inciertas (Ballard & Morrow, 2013).

Se ha sugerido que las células fagocíticas de la leche materna poseen la capacidad de ofrecer protección en contra de patógenos, además, pueden estimular el desarrollo del sistema inmune del neonato (Ballard & Morrow, 2013).

2.2.2 Inmunoglobulina A (IgA) en calostro

El isotipo IgA tiene dos subtipos en humanos, IgA1 e IgA2, derivados de dos genes distintos para la región constante de la cadena pesada (C α) (Woof & Kerr, 2004). Además, muestran una ubicación diferencial en los tractos mucosos: IgA1 se encuentra predominantemente en la piel, suero, saliva y tracto respiratorio alto,

mientras que IgA2 se localiza en el intestino grueso y delgado (Pakkanen *et al.*, 2010).

Las inmunoglobulinas presentes en el calostro humano, principalmente IgA en su forma secretora (sIgA), son producidas por células plasmáticas en la glándula mamaria, que son originadas de células B provenientes del intestino delgado y de las ramificaciones bronquiales (Goldman *et al.*, 2002; Goldman, 2000).

2.2.2.2 Características y función de IgA1 e IgA2 en calostro

En humanos, IgA1 e IgA2 difieren en la región bisagra. IgA1 posee una región rica en prolina de 13 aminoácidos, mientras que IgA2 carece de dicha región. Esta variación le permite a la IgA2 ser resistente a la digestión por proteasas bacterianas (Corhtesy, 2010; Kilian, Mestecky & Russell, 1988).

De las principales funciones que se han estudiado sobre IgA en leche materna, es su habilidad para unirse a bacterias en el intestino del infante. Sus consecuencias son diversas y han sido parcialmente elucidadas; dentro de las cuales incluye la neutralización y bloqueo de la unión de microorganismos a las células del hospedero, de manera similar, bloquean la translocación de microorganismos entre los compartimientos internos, inhiben la respuesta de células T, modifican la expresión de genes y el metabolismo de microorganismos (Relman, 2019).

En condiciones de inflamación, IgA puede reclutar el complemento. Sin embargo, comparado con el isotipo IgM e IgG, el isotipo IgA estimula de manera precaria la activación del complemento (Bunker & Bendelac, 2018).

2.2.2.3 Reconocimiento de IgA en calostro

Los niveles de IgA y su especificidad en el calostro humano es reflejo del ambiente al cual la madre fue expuesta: presión microbiana, contacto con animales, antígenos dietarios e inmunización durante el embarazo (Rajani *et al.*, 2018).

Sánchez-Salguero y colaboradores determinaron una presencia diferencial en los niveles de IgA1 e IgA2 en calostro dependiendo de los episodios infecciosos durante el embarazo. Los niveles de IgA1 fueron mayores cuando se registró una infección

respiratoria en la madre, mientras que se determinaron niveles altos de IgA2 cuando se registró una infección en el tracto gastrointestinal.

2.3 Impacto de la vacunación en el calostro

La vacunación durante el periodo de gestación induce la producción de anticuerpos en secreciones y suero, además, estimula la transferencia de anticuerpos anti-antígenos vacunables por vía placentaria (Healy, 2012; Omer, 2017). Gran parte de los estudios sobre los efectos de la vacunación sobre el periodo gestación, se han dirigido hacia la prevención de la enfermedad en la madre, con ello, evitando la enfermedad en el neonato (Omer, 2017).

Se ha determinado la inducción de anticuerpos IgA como consecuencia de la vacunación de una variedad de antígenos en diferentes periodos del embarazo. Por ejemplo, la vacunación en contra *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib) en mujeres embarazadas, a través de la vacuna de polisacárido capsular polirribosilribitol fosfato (PRP), mostró ser segura y generó una alta cantidad de anticuerpos anti-Hib en suero y leche materna (Englund & Glezen, 2003). La inmunización con polisacáridos del meningococo durante la gestación indujo la presencia de IgA en contra del serotipo A en la leche materna, además, los anticuerpos persistieron hasta 6 meses después del parto (Healy & Baker, 2007).

2.4 *Streptococcus pneumoniae*

2.4.1 Características microbiológicas

Streptococcus pneumoniae, también conocido como neumococo, es una bacteria patógena oportunista Gram positiva y capsulada, que causa enfermedades en las vías respiratorias altas (Weiser *et al.*, 2018).

Las células poseen una forma lanceolada, las cuales miden de 0.5 a 1.2 μm de diámetro y se agrupan en pares (diplos). Cuentan con un metabolismo anaerobio facultativo (Prado, 2001).

Los aspectos morfológicos particulares de *S. pneumoniae* son: a) cápsula, compuesta de polisacáridos que se ubica sobre la pared celular bacteriana, y tiene

una función en la evasión del sistema inmune, al ser antifagocítica y al bloquear estéricamente la fijación de proteínas del complemento; b) pared celular, que posee una composición clásica de las bacterias Gram positivas, peptidoglucano (N-acetil glucosamina, ácido N-acetil murámico y residuos de lisina que forma enlaces peptídicos) y ácido teicoico, este último contiene un esqueleto de ribitol fosfato covalentemente unido a fosforilcolina; c) pili, el cual es una estructura filamentosa multimérica que se encuentra unida a la pared celular (Henriques-Normak & Tuomanen, 2013).

S. pneumoniae posee una competencia natural, lo que la hace una bacteria capaz de tomar ADN del medio en el que se encuentra. Este proceso se lleva a cabo por péptidos estimulantes de competencia (CSP1 y CSP2), los cuales interactúan con el sistema ComD/E para la activación de operones, respuesta que culmina en la expresión de genes para la unión y toma del material genético (Henriques-Normak & Tuomanen, 2013).

Se han reportado 98 serotipos distintos de *S. pneumoniae* (Geno *et al.*, 2017), y se considera un serotipo como una cepa de neumococo la cual produce un polisacárido capsular con una estructura química y propiedades serológicas únicas (Geno *et al.*, 2015).

2.4.2 Relevancia médica y epidemiología

Las infecciones causadas por *S. pneumoniae* pueden generar diferentes manifestaciones clínicas, que se encuentran en función a las características del huésped, el agente causal y el ambiente. Se clasifican en dos tipos: 1) infecciones invasivas o invasoras, en las cuales se presenta una diseminación por medio de la sangre con o sin localización secundaria en un sitio normalmente estéril. Las principales infecciones invasivas son neumonía, meningitis y sepsis. 2) Infecciones no invasivas, las cuales la forma de diseminación es canicular (a través de canales o ductos presentes en el cuerpo humano). Las infecciones no invasivas incluyen la otitis media aguda, sinusitis, conjuntivitis, entre otras (Reyes-Gómez *et al.*, 2011).

La transmisión ocurre en forma de aerosoles y por el contacto con secreciones nasales (Henriques-Normak & Tuomanen, 2013; Weiser *et al.*, 2018). La diseminación requiere la interacción cercana con niños pequeños, los cuales son

los principales portadores (Weiser *et al.*, 2018). Los niños menores de 5 años son portadores de *S. pneumoniae*, alrededor del 27% de los niños en países desarrollados, mientras que en países en desarrollo se presenta en el 85% de la población infantil (WHO, 2012). Existe una mayor frecuencia de la transmisión durante meses fríos y secos, dado que las secreciones de las vías aéreas son más abundantes y existe una mayor probabilidad de que ocurra en conjunto con una infección viral de las vías respiratorias altas (Musher, 2003; Numminen *et al.*, 2015; Gwaltney *et al.*, 1975).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud en 2008, aproximadamente 500,000 niños menores de 5 años alrededor del mundo murieron a causa de enfermedades neumocócicas, y la mayor parte de esas muertes se registraron en países en desarrollo. La principal causa de mortalidad por *S. pneumoniae* es por neumonía (GDB Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018). En México, la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud reportó en 2004, una incidencia de enfermedades neumocócicas de 47,849 en niños menores de 1 año, y de 46,760 en niños de 1 a 4 años.

La distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* causantes de enfermedad varían por factores como la edad, la ubicación geográfica y el tiempo (WHO, 2011).

El estudio epidemiológico de la distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* ha revelado ciertas tendencias, de acuerdo a las características de incidencia y efecto en el huésped. Los serotipos 6B, 9V, 14, 19F y 23F, de acuerdo con la nomenclatura danesa, son comúnmente encontrados en niños pequeños. Los serotipos 1 y 7F, se encuentran altamente involucrados en enfermedades invasivas (cuentan con un alto potencial invasor), mientras que otros serotipos se encuentran más relacionados solo con la portación (Henriques-Normak & Tuomanen, 2013). Sin embargo, se han encontrado que las tasas de mortalidad más altas están relacionadas con serotipos de bajo potencial invasor, es el caso de los serotipos 3, 6B y 19F (Sandgren *et al.*, 2004).

2.4.3 Polisacáridos capsulares

Los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* son de gran interés como factores de virulencia y como inmunógenos, estos últimos para la prevención de enfermedades específicas del serotipo (Bush *et al.*, 2014).

La composición química de la cápsula consiste en unidades repetidas de azúcares, generalmente tiene de dos a ocho residuos de un monosacárido, y puede encontrarse sustituciones por grupos O-acetil, fosfoglicerol y piruvil acetal en diferentes ubicaciones dentro de la estructura y a distintas frecuencias (Calix *et al.*, 2012). Las estructuras más simples de polisacáridos capsulares son polímeros lineales, en donde las unidades repetidas solo son dos o más monosacáridos, mientras que los más complejos, son polisacáridos ramificados con el esqueleto formado por unidades repetidas, las cuales pueden estar compuestas por uno a seis monosacáridos con los correspondientes sustituyentes como cadenas laterales (Figura 2) (Paton & Trapetti, 2018).

De los 98 serotipos documentados a la fecha, solo se ha determinado la estructura química de las uniones repetidas para alrededor del 70% de ellos (Geno *et al.*, 2015).

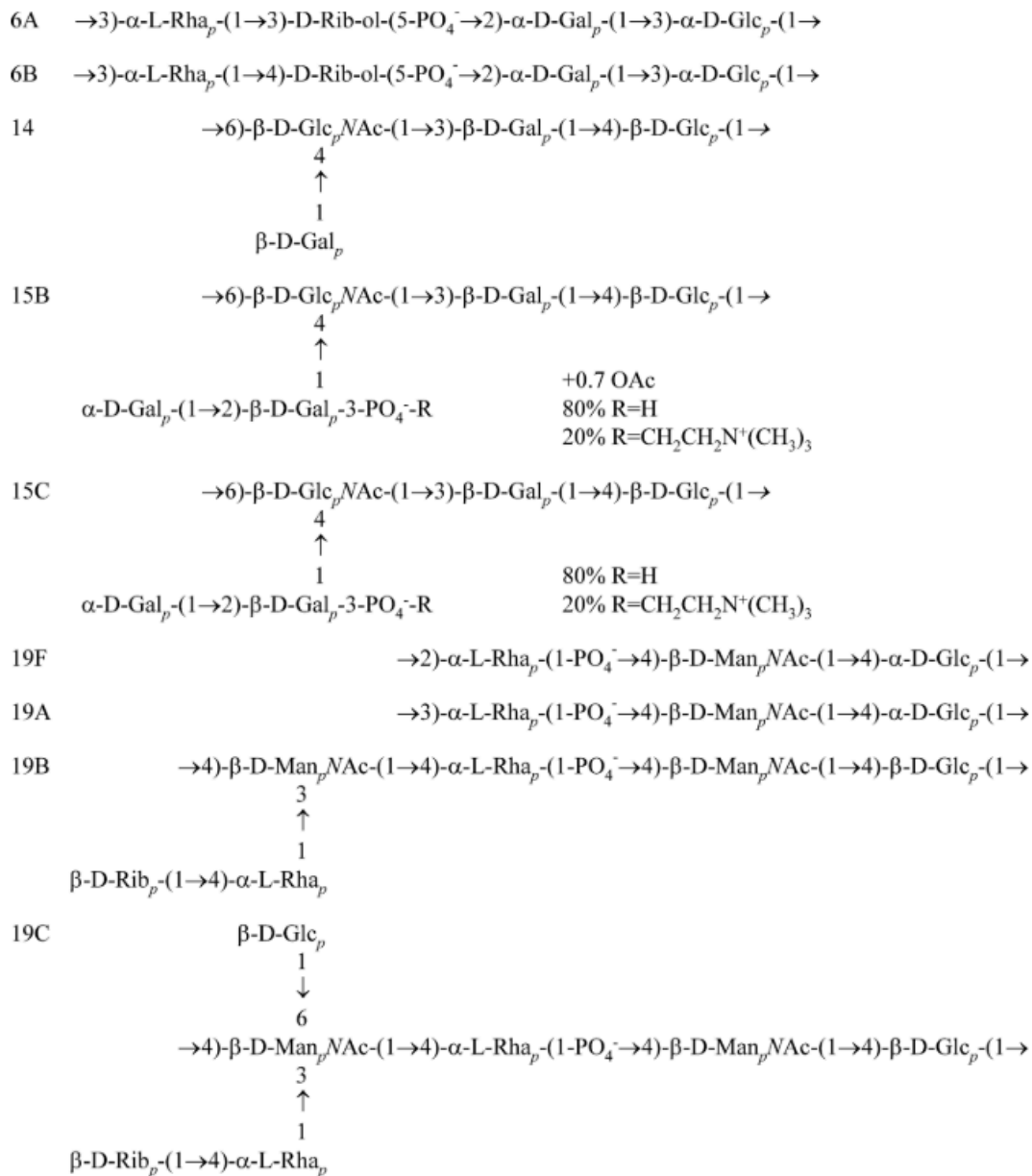


Figura 2. Diferentes estructuras de las unidades repetidas de 9 serotipos de *S. pneumoniae*: 6A, 6B, 14, 15B, 15C, 19F, 19A, 19B, 19C. Se considera como el inicio de la unidad repetida al residuo Glc. Imagen tomada de Paton y Trappetti, 2018.

La diversidad de serotipos yace en las variaciones en el locus *cps*, que codifica proteínas que intervienen en la síntesis de polisacáridos capsulares. Las variaciones son en los genes presentes en cada serotipo, además, de diferencias a nivel secuencia, que ocasionan desigualdades en el porcentaje de identidad entre serotipos relacionados (Paton & Trappetti, 2018).

La cápsula de *S. pneumoniae* es considerada el factor de virulencia más importante, al evadir el sistema inmune del hospedero (Weiser, Ferreira & Paton, 2018; Patton & Trappetti, 2015). La cápsula lleva a cabo diversos mecanismos dependiendo de la zona anatómica donde se encuentre:

- En zonas mucosas, se considera que promueve la colonización de la nasofaringe. Este efecto es causado porque la mayoría de los polisacáridos capsulares a pH fisiológico se encuentran altamente cargados, consecuentemente, se genera una repulsión de los mucopolisacáridos ricos en ácido siálico, evitando que la bacteria sea atrapada en el moco. Igualmente, facilitando el acceso y la unión a las células epiteliales (Nelson *et al.*, 2007).
- La cápsula evita la activación del complemento, tanto la ruta clásica como la alternativa, al cubrir estructuras profundas en la pared celular, que no pueden ser alcanzadas por inmunoglobulinas, la proteína C reactiva o por componentes del complemento (Patton & Trappetti, 2015; Hyams *et al.*, 2003).
- Al reducir la interacción de inmunoglobulinas y C3b/iC3b unidas a estructuras bacterianas, con sus receptores cognados en células fagocíticas, disminuye la opsonización (Hyams *et al.*, 2003).

2.4.4 Vacunación en contra de *S. pneumoniae*

De acuerdo con el esquema de vacunación de México, establecido por la Secretaría de Salud, la vacunación en contra de *S. pneumoniae* en infantes se realiza con la vacuna de conjugada de neumococo a los 2 meses, 4 meses y 6 meses. Por otro lado, la vacunación de personas mayores de 2 años en situación de riesgo y adultos mayores de 65 se lleva a cabo con la vacuna de polisacáridos capsulares.

Dado que los polisacáridos capsulares son el principal factor de virulencia de *S. pneumoniae*, este es el antígeno usado en las formulaciones de las vacunas actuales (Maimoni-Gonçalves *et al.*, 2019).

La protección de infantes por medio de la vacunación neonatal está limitada por inmadurez del sistema inmune para generar una respuesta adaptativa efectiva, además, por el hecho de que, a pesar de la vacunación, la enfermedad puede

proseguir (Healy, 2012). Es por ello que se han desarrollado dos tipos de vacunas para generar una protección efectiva. Los dos tipos de vacunas, que son administradas por una ruta parenteral, son la vacuna de polisacáridos de neumococo 23 valente (PPV-23) y vacunas conjugadas de neumococo, PCV7, PCV10 y PCV13. La valencia corresponde a número de polisacáridos de diferentes serotipos incluidos en la formulación de la vacuna (Maimoni-Goncalves *et al.*, 2019).

2.4.4.2 Vacuna de polisacáridos capsulares (PPV-23)

Los polisacáridos capsulares son antígenos independientes a células T, lo que significa que no producen memoria inmunológica o que no requieren la cooperación de células T para ejercer una respuesta inmunológica, dado que no son presentados por el MHC. De manera más específica, los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* son antígenos T independientes de tipo 2 (TI-2), al ser una estructura molecular repetida y solo activar células B maduras (Lesinski & Westerink, 2001).

Los antígenos en esta vacuna estimulan a los linfocitos B de la zona marginal en el bazo, los cuales maduran hasta que el individuo se encuentra en su segundo año de vida (Timens *et al.*, 1989), por lo tanto, en niños menores de 2 años, la vacuna PPV-23 no es efectiva (Clutterbuck *et al.*, 2012). Mientras que su efectividad en adultos ha sido cuestionada, en diferentes metaanálisis no se ha podido demostrar su efectividad por las inconsistencias presentadas (Schiffner-Rohe *et al.*, 2016; Tin Htar *et al.*, 2017)

La vacuna PPV-23 fue licenciada en 1983 y cubre aproximadamente el 90% de los aislados de neumococo que son invasivos (Robbins *et al.*, 1983). Su formulación comprende los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F y 33F. Posee 25 ug de cada serotipo y no contiene adyuvante (Geno *et al.*, 2015).

2.4.4.3 Vacunas conjugadas (PCV7, PCV10 y PCV13)

Las vacunas conjugadas consisten en los polisacáridos capsulares purificados unidos covalentemente a una proteína inmunogénica acarreadora (Lesinski & Westerink, 2001). Estas vacunas fueron desarrolladas para ser inmunogénicas en infantes menores de 2 años (Geno *et al.*, 2015).

Las proteínas acarreadoras difieren en cada tipo de vacuna conjugada. En la vacuna PCV10, el serotipo 18 está unido al toxoide tetánico, el serotipo 19F al toxoide de difteria (DT), y los serotipos restantes (1, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) a la proteína D (lipoproteína recombinante de 42kDa de *Haemophilus influenzae*). En las vacunas PCV7 y PCV13, todos los serotipos están conjugados a la proteína CRM₁₉₇ (variante de DT) por medio de una aminación reductiva (Poolman, Peeters & van den Dobbelsteen, 2013).

Estas vacunas han mostrado su efectividad, al ejercer la producción de anticuerpos en contra de la cápsula de los polisacáridos presentes en la vacuna, lo cual reduce la prevalencia de portación y la densidad de esos serotipos. Sin embargo, se ha reportado un aumento de la incidencia en la portación y desarrollo de enfermedades neumocócicas invasivas causadas por serotipos no vacunables, evidenciando el reemplazamiento de serotipos (Geno *et al.*, 2015).

2.5 Anticuerpos en calostro contra polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*

En 1989, Ladjeva, Peterman & Mestecky evaluaron los niveles de IgA1 e IgA2 en 18 muestras de calostro humano. Su estudio se enfocó en antígenos dietarios y microbianos, incluyendo polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*. Concluyendo que para el neumococo, no existía una relación diferencial entre los niveles de IgA1 e IgA2. Sin embargo, su estudio carece de un análisis en relación a la historia clínica de la madre durante el periodo de gestación.

Se ha evaluado la vacunación con los polisacáridos del neumococo para mostrar su efecto protector al recién nacido, pero la información sigue siendo escasa (Chaithongwongwatthana *et al.*, 2015), al no haber estudios sobre la relación de los subtipos de las inmunoglobulinas IgA y su posible función. Mientras que otros estudios han revelado la presencia de anticuerpos IgA específicos en la leche materna después de 4 a 6 meses del parto, además, estudios *in vitro* mostraron que la adherencia del serotipo 14 del neumococo al epitelio se vio disminuida cuando el calostro de madres inmunizadas se encontraba presente (Healy, 2012).

3 JUSTIFICACIÓN

La información sobre los niveles de los subtipos de inmunoglobulina A; IgA1 e IgA2, dirigidos en contra de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* en calostro humano es escasa, en especial datos de la población mexicana. Su estudio, con un enfoque en el proceso de vacunación, lo hace atractivo para elucidar efectos de la vacunación en el calostro y su posible rol en la protección del infante. Además, se contribuye con información para los protocolos de vacunación durante el proceso de gestación, al igual que promueve el desarrollo, descubrimiento y mejora de vacunas que pueden tener un efecto en recién nacidos. Igualmente, se aporta datos que apoyan la importancia del proceso de la lactancia materna.

4 HIPÓTESIS

Las madres mexicanas que fueron vacunadas durante el periodo de gestación contra *Streptococcus pneumoniae* presentarán mayores niveles de anticuerpos que reconocen polisacáridos capsulares en comparación con las madres que no fueron vacunadas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los niveles presentes de IgA1 e IgA2 en el calostro de mujeres mexicanas que reconocen algunos de los 23 serotipos de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* procedentes de la vacuna Pulmovax.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar mediante ELISA indirecta cuantitativa los niveles de IgA1 e IgA2 que reconocen polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*.
- Comparar los niveles de IgA1 e IgA2 en calostro con la vacunación durante el periodo de gestación.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Calostros

Se analizaron 113 muestras de calostro de mujeres mexicanas de entre 20 a 35 años, procedentes de tres hospitales distintos de la Ciudad de México y el Estado de México: Hospital 1º de Octubre del ISSSTE, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca y el Hospital de la Mujer. Del número total de muestras de calostro, 55 de ellas provinieron de madres que tuvieron un parto por vía vaginal, mientras que los 56 restantes por cesárea. Por otro lado, 108 de las muestras corresponde de madres primerizas, 3 de madres que es su segundo parto y 2 de madres que es su tercer parto.

6.2 Suero de referencia

Para realizar la curva estándar en el ensayo ELISA indirecta cuantitativa, se empleó un suero de referencia. Dicho suero correspondió a una mezcla de suero de madres de 20 a 35 años de edad, que, de acuerdo con sus respectivos historiales clínicos, fueron vacunadas en contra de *S. pneumoniae* durante el proceso de gestación.

6.3 Pulmovax: vacuna de polisacáridos capsulares

Para el estudio se empleó la vacuna antineumocócica de 23 polisacáridos capsulares, Pulmovax® MSD 0.5 mL. Los serotipos presentes en la vacuna, de acuerdo con la nomenclatura danesa, son 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, y 33F. Cada serotipo se encontraba en una cantidad de 25 µg, en una solución isotónica de NaCl con 0.25% de fenol como conservador.

6.4 Análisis experimental

El pretratamiento de las muestras de calostro consistió en la centrifugación de las muestras a 2000 g por 10 minutos a 4º C (centrífuga Allegra X-22R Benchtop Cetrifuges Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, EUA), posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias.

Para la detección de anticuerpos IgA1 e IgA2 presentes en el calostro humano en contra polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* se realizó la prueba ELISA cuantitativa de la siguiente manera.

Se sensibilizó los pozos requeridos de la placa MaxiSorp (Thermo Scientific, Nueva York, EUA) con 50uL de polisacáridos capsulares (Pulmovax, polisacárido capsular aislado de 23 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*) 10 ug/ml diluido en PBS 1X, se incubó a 37° C durante 5 horas; posteriormente, se volvió a incubar a 4° C por 12 horas.

Se lavó la placa con 100 uL PBS-Tween20X 0.05% (Tween 20, Sigma-Aldrich Company®, USA) ocho veces (los posteriores lavados se realizaron con el mismo sistema amortiguador). Se bloqueo con 50uL de PBS 1X-Tween 0.05% BSA 5% (BSA, Sigma-Aldrich Company®, EUA) suero fetal bovino 1% (SFB, Biowest®, Riverside, MO, EUA) a los pozos donde se sensibilizó con IgA2 durante 1 hora a 37° C. Para los pozos donde se analizó IgA1, el agente de bloqueo consistió en PBS 1X-Tween 0.05%. Se lavó por cinco veces.

Se añadieron 50 uL calostro a una dilución de 1:100 por triplicado; la placa se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Dependiendo los controles a emplear, no se les agregó muestra de calostro. Después de la incubación, la placa fue lavada cinco veces.

Se agregaron 50 uL de anticuerpo secundario: anti-IgA1 1:2500 (anticuerpo monoclonal de ratón, Abcam®) o anti IgA2 1:2000 (anticuerpo monoclonal de ratón, Abcam®), dependiendo el anticuerpo a cuantificar. Se incubó la placa durante 45 minutos a 37° C, y posteriormente se lavó cinco veces. Se añadieron 50 uL de estreptavidina-HRP 1:5000 (estreptavidina HRP, Abcam®); la placa se incubó por 45 minutos a 37° C, y finalmente se lavó cinco veces.

Para revelar se agregaron 50uL de TMB 1X (3'3''-5-5-tetrametilbenzidina, Abcam®), el cual se dejó reaccionar hasta un cambio de color (3 minutos aproximadamente); posteriormente, se adicionaron 50 uL de ácido sulfúrico 0.2M. La densidad óptica en los pozos se leyó con un lector de ELISA (Sunrise, Tecan®, TX, EUA) a 450 nm. Las concentraciones de los anticuerpos IgA1 e IgA2 se calcularon de acuerdo con una curva de calibración usando el suero de referencia.

6.5 Análisis estadístico

Se determinó el tipo de distribución de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para el análisis estadístico de los niveles de los subtipos de IgA, se empleó un intervalo de confianza de 95%. La evaluación estadística de dos grupos de datos se realizó con la prueba de U de Mann-Whitney, mientras que para el análisis de más de tres grupos de datos se realizó la prueba Kruskal-Wallis. El análisis estadístico de los datos y gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism (Software GraphPad® versión 8, La Jolla, CA, EUA)

7 RESULTADOS

Se analizaron 113 muestras de calostro provenientes de mujeres de dos hospitales de la Ciudad de México; el Hospital 1° de Octubre ISSSTE (HO, 35 muestras, 30.97%) y el Hospital de la Mujer (HM, 38 muestras, 33.63%), y un hospital del Estado de México; el Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca (HI, 40 muestras, 35.40%). La edad promedio de las madres fue de 27.19 ± 5.2 años, mientras que el número de madres de acuerdo con el tipo de parto correspondió a 55 partos por vía vaginal (48.67%) y 56 partos por cesárea (51.33%). El número de parto correspondió al siguiente: su primer parto 108 mujeres (95.57%), 3 mujeres su segundo parto (2.65%) y 2 mujeres su tercer parto (1.77%). El estado de vacunación en contra *S. pneumoniae* fue el siguiente: 98 mujeres fueron vacunadas durante el periodo de gestación (86.72%) y 15 mujeres no fueron vacunadas durante el periodo de gestación (13.27%) (Tabla 1). El rango de tiempo en el cual las muestras de calostro fueron tomadas fue desde 7 horas hasta 72 horas después del parto.

Característica	Frecuencias (%)	
Hospital	Hospital 1° de Octubre ISSSTE	35 (30.97%)
	Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca	40 (35.40%)
	Hospital de la Mujer	38 (33.63%)
Edad	27.19 ± 5.2 años (promedio)	
Tipo de parto	Vía vaginal	55 (48.67%)
	Vía cesárea	56 (51.33%)
Número de partos	1°	108 (95.57%)
	2°	3 (2.65%)
	3°	2 (1.77%)
Vacunación contra <i>S. pneumoniae</i>	Vacunadas	98 (86.72%)
	No vacunadas	15 (13.27%)

Tabla 1. Características y su correspondiente frecuencia de las 113 muestras de calostro de las madres. Se muestra el hospital de procedencia de la madre, la edad promedio, el tipo de parto, el número de partos de la madre y su estado de vacunación en contra *S. pneumoniae* durante el periodo de gestación.

La evaluación de los niveles de IgA1 e IgA2 de las 113 muestras que reconocen alguno de los 23 polisacáridos capsulares presentes en la vacuna Pulmovax®, mediante la técnica de ELISA cuantitativa, resultó en niveles mayores de IgA2 (promedio 1168 ± 555.9 ng/ml) que de IgA1 (promedio 513.8 ± 356.2ng/ml) (Figura 3). Estos valores mostraron una diferencia significativa de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.001$.

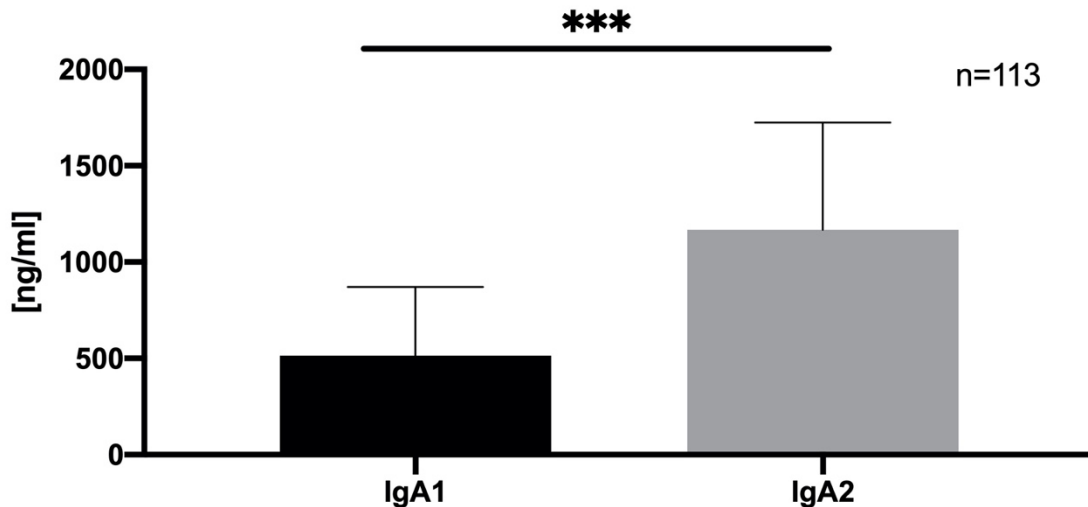


Figura 3. Niveles de IgA1 e IgA2 que reconocen polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* de la vacuna Pulmovax en muestras de calostro (n=113). Las barras muestran los valores promedio y su desviación estándar: promedio de IgA1 1168 ± 555.9 ng/ml e IgA1 513.8 ± 356.2ng/ml. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba de Mann-Whitney. ***p<0.001

Evaluando los niveles de los subtipos de IgA en calostro, segregando por su estado de vacunación en contra de *S. pneumoniae*, 98 mujeres vacunadas contra 15 mujeres no vacunadas, resultó en lo siguiente (Figura 4). Los niveles de IgA1 en calostro resultaron ser mayores en mujeres que fueron vacunadas (promedio 534.4 ± 333.5 ng/ml) en comparación a sus contrapartes no vacunadas (promedio 378.9 ± 472.4 ng/ml); con una diferencia significativa, p=0.01. Por otro lado, los niveles de IgA2 mostraron una diferencia mayor en calostro de mujeres vacunadas contra los niveles de mujeres no vacunadas, promedio 1238 ± 537.8 ng/ml y 723.6 ± 467.8 ng/ml, respectivamente. Estos valores presentaron una diferencia significativa, p=0.001.

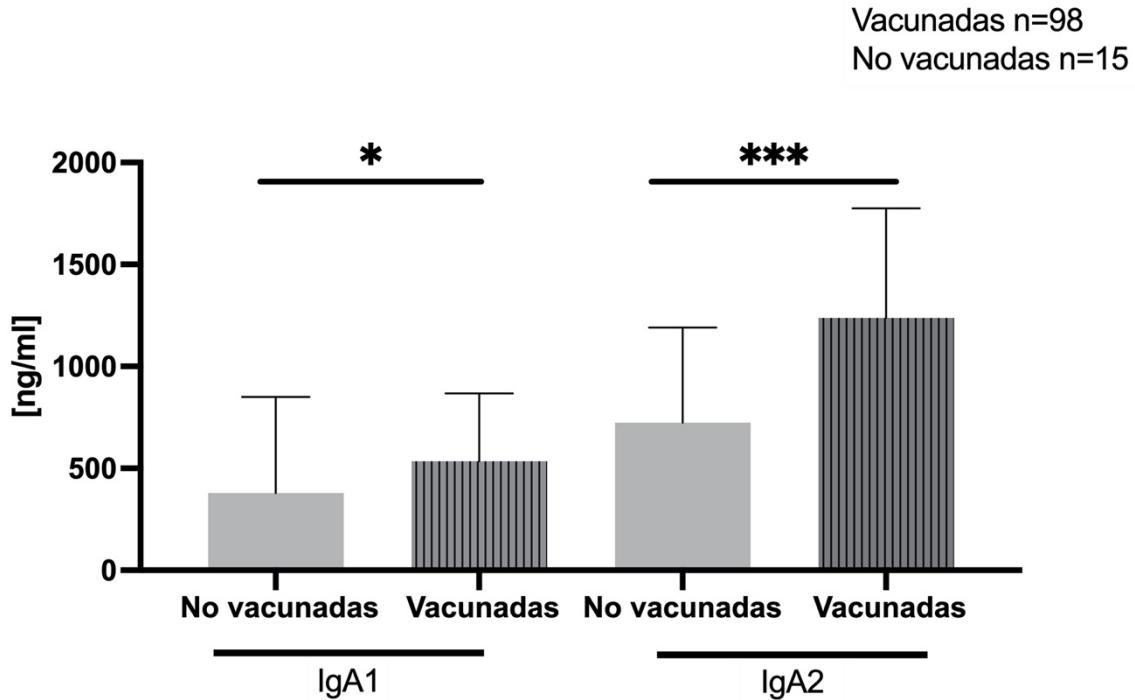


Figura 4. Niveles de IgA1 e IgA2 de calostro de mujeres vacunadas (n=98) y no vacunadas (n=15). Las barras muestran los valores promedio y su desviación estándar. Los niveles de IgA1 de ambos grupos, mujeres no vacunadas (promedio 378.9 ± 472.4 ng/ml) y mujeres vacunadas (promedio 534.4 ± 333.5 ng/ml) presentó una diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney. * $p < 0.05$. Los niveles de IgA2 de ambos grupos, mujeres no vacunadas (promedio 723.6 ± 467.8 ng/ml) y mujeres vacunadas (promedio 1238 ± 537.8 ng/ml) presentó una diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney. *** $p < 0.001$.

Al evaluar el efecto del tipo de parto (por vía vaginal o cesárea) y estado de vacunación en los niveles de IgA1 e IgA2 en calostro, resultó en lo siguiente. En las mujeres que se sometieron al procedimiento quirúrgico, los niveles de IgA1 son mayores en aquellas mujeres que fueron vacunadas durante su periodo de gestación (promedio 498.4 ± 359.9 ng/ml) que las que no fueron vacunadas (promedio 222.6 ± 209.1 ng/ml), $p = 0.0115$. Mientras que, dentro de este mismo grupo, mujeres sometidas a cesárea, los niveles de IgA2 resultaron ser mayor en mujeres vacunadas (promedio 1190 ± 557.1 ng/ml) que en mujeres no vacunadas

(promedio 758.7 ± 384.9 ng/ml), $p=0.0096$. Por otro lado, dentro del grupo de las mujeres que tuvieron un parto por vía vaginal, no se presentó una diferencia entre los niveles de IgA1 en el calostro de las mujeres vacunadas en el periodo de gestación (promedio 569.5 ± 306.5 ng/ml) en comparación con el calostro de las mujeres que no fueron vacunadas (promedio 691.5 ± 704.5 ng/ml), $p=0.8403$. Los niveles de IgA2 en las muestras de calostro de mujeres con parto por vía vaginal resultaron mayores en las que fueron vacunadas (promedio 1281 ± 521.7 ng/ml) en comparación con las que no lo fueron vacunadas (promedio 653.5 ± 650.7 ng/ml), $p=0.0384$ (Figura 5). De manera similar con los resultados de la figura 3, los niveles de IgA2 fueron mayores que los niveles de IgA1 en ambos grupos de mujeres.

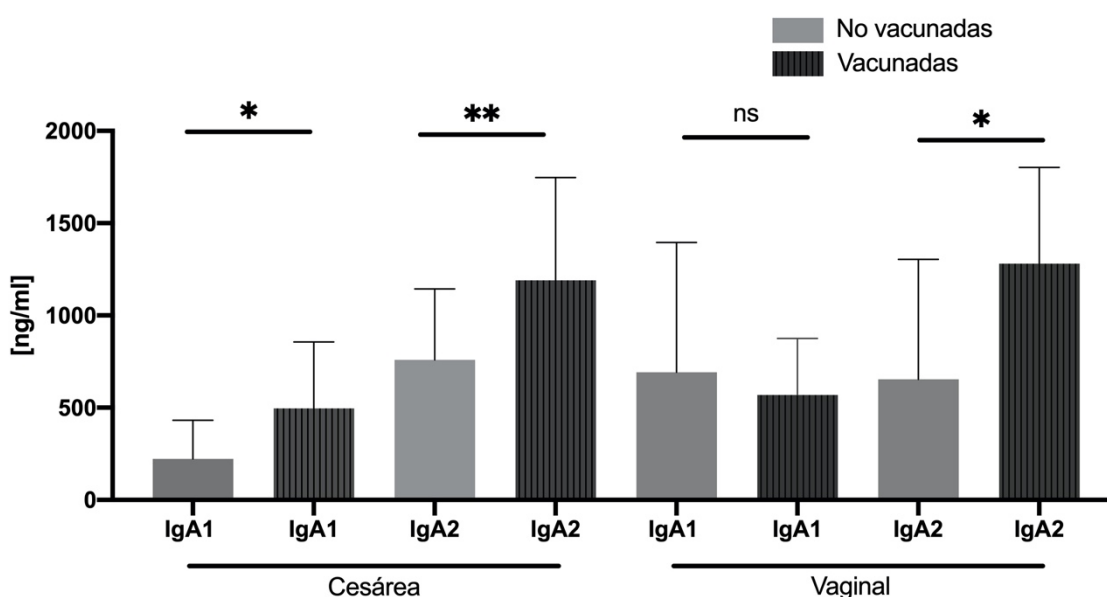


Figura 5. Niveles de IgA1 e IgA2 en calostro de acuerdo con su estado de vacunación de mujeres que se sometieron a parto por cesárea o por vía vaginal. Las barras muestran los valores promedio y su desviación estándar. Los niveles de IgA1 en calostro, de mujeres que tuvieron parto por cesárea, son mayores en mujeres vacunadas que las mujeres no vacunadas, con un promedio de 498.4 ± 359.9 ng/ml contra 222.6 ± 209.1 ng/ml, respectivamente. $*p<0.05$. Los niveles de IgA2 en calostro, de mujeres que tuvieron parto por cesárea, son mayores en mujeres vacunadas que las mujeres no vacunadas, con un promedio de $1190 \pm$

557.1 ng/ml contra 758.7 ± 384.9 ng/ml, respectivamente. $**p < 0.05$. Para el grupo de mujeres que se sometió a un parto por vía vaginal, los niveles de IgA1 de mujeres vacunadas y no vacunadas no mostraron una diferencia significativa. ns= no significativo. Mientras que los niveles promedio de IgA2 fueron mucho más altos en mujeres vacunadas 1281 ± 521.7 ng/ml, que en mujeres no vacunadas 653.5 ± 650.7 ng/ml. $*p < 0.05$

Los niveles de IgA1 e IgA2 en calostro, comparando el tipo de parto (vaginal o cesárea) resultó en lo siguiente (Figura 6). Para los niveles de IgA1, las mujeres que tuvieron un parto por vía vaginal, sus muestras de calostro resultaron en mayores niveles de inmunoglobulinas que reconocen polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* (promedio 580.4 ± 352.8 ng/ml), que aquellas mujeres que se sometieron a cesárea (promedio 448.4 ± 352.8 ng/ml), $p = 0.0146$. Mientras que para los niveles de IgA2, los calostros presentaron niveles más altos que para IgA1, sin embargo, al comparar entre mujeres que tuvieron un parto por vía vaginal y por cesárea; promedio de 1224 ± 558.1 ng/ml y 1111 ± 552.9 ng/ml, respectivamente. Estos valores no mostraron una diferencia significativa, $p = 0.1978$.

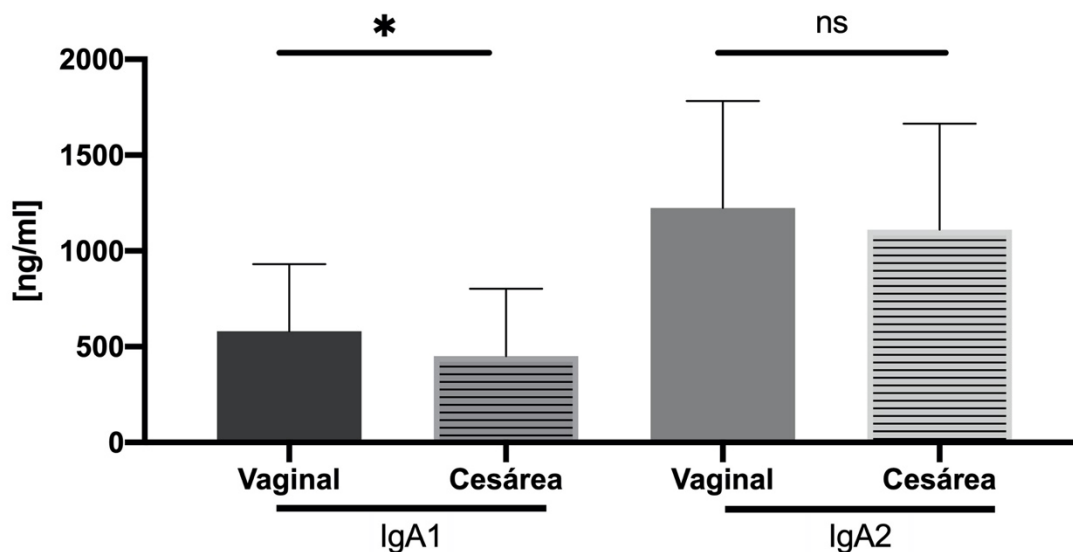


Figura 6. Comparación de los niveles de los subtipos de IgA en calostro humano de acuerdo con el tipo de parto. Las barras muestran los valores promedio y su

desviación estándar. Los niveles de IgA1 fueron mayores en muestras de calostro en las que las madres se sometieron parto por vía vaginal que las que se sometieron a cesárea, promedio de 580.4 ± 352.8 ng/ml contra 448.4 ± 352.8 ng/ml, respectivamente. $*p < 0.05$. Los niveles de IgA2 en calostros provenientes de ambos grupos de mujeres, mujeres con parto por vía vaginal y cesárea, no presentaron una diferencia significativa. ns= no significativa.

Al comparar los niveles de IgA1 e IgA2 de los calostros con su hospital de procedencia se obtuvo lo siguiente (Figura 7). Para los niveles de IgA1 entre el Hospital de la Mujer (HM), el Hospital 1° de Octubre ISSSTE (HO) y el Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca; no se presentó una diferencia significativa, $p = 0.3079$. De manera semejante, los niveles de IgA2 de los mismos hospitales no presentaron una diferencia significativa, $p = 0.0753$.

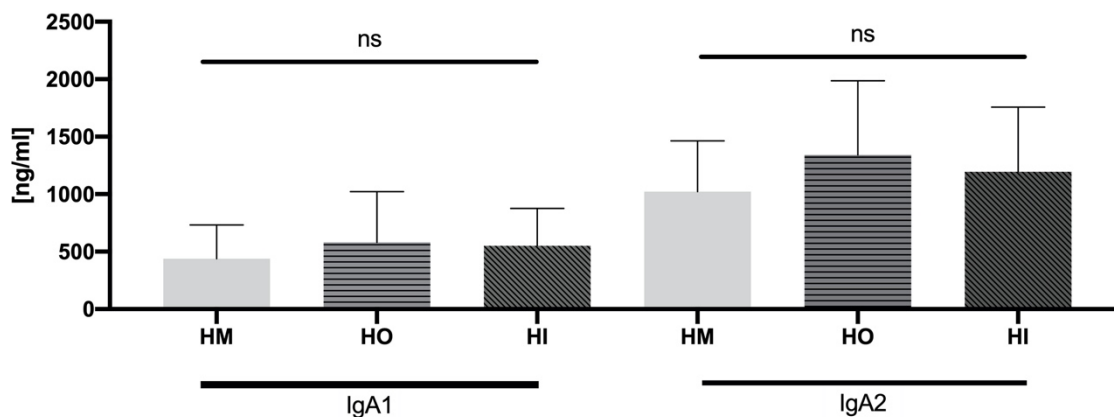


Figura 7. Niveles de IgA1 e IgA2 de acuerdo con el hospital de procedencia de las muestras de calostro. Las barras muestran los valores promedio y su desviación estándar. No se presentó una diferencia significativa entre los niveles de IgA1 ni de IgA2 usando la prueba estadística Kruskal Wallis en ambos grupos. ns= no significativa. HM=Hospital de la Mujer, HO= Hospital 1° de Octubre ISSSTE, HI= Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca.

8 DISCUSIÓN

La población estudiada mostró una proporción equitativa con respecto al hospital de procedencia de los calostros (HO 30.97%, HI 35.40% y HM 33.63%) y el tipo de parto al que se sometieron las madres (vaginal 48.67% y cesárea 51.33%). Mientras que la mayoría de las muestras de calostro procedieron de mujeres primerizas (95.57%) y vacunadas contra *S. pneumoniae* (86.72%).

El principal isotipo de IgA que se encontró en las muestras de calostro fue IgA2 (Figura 3), de igual manera, las madres que fueron vacunadas presentaron niveles mayores de ambos subtipos de IgA, con notables niveles de IgA2 (Figura 4). IgA2 se ubica en zonas mucosas del intestino grueso y delgado (Pakkanen *et al.*, 2010). Por otro lado, la inmunoglobulina IgA1 se encuentra en mucosas de vías respiratorias altas, donde *S. pneumoniae* puede iniciar el proceso de colonización en el hospedero (Weiser, Ferreira & Paton, 2018). Se ha demostrado que IgA1 reconoce con mayor afinidad antígenos de naturaleza proteica (Ladjeva, Peterman & Mestecky, 1989), mientras que en este trabajo se analizaron carbohidratos que fueron reconocidos principalmente por IgA2, lo cual es congruente con anteriores estudios (Zheng *et al.*, 2020).

Se han propuesto dos hipótesis para interpretar la elevada presencia de IgA2 sobre IgA1 (Tregoeat, *et al.*, 2001), que son aplicables a los resultados de este estudio. La primera, desde un enfoque evolutivo, explica que bacterias con las enzimas necesarias para degradar IgA1 humana en su región bisagra contribuyen a los niveles diferenciales de IgA. Esto es coherente con *S. pneumoniae* dado que posee la metaloproteínasa dependiente de zinc ZmpA (también conocida como proteasa de IgA1) (Weiser, Ferreira & Paton, 2018). La segunda hipótesis expone que la producción de IgA1 alcanza un nivel establecido, lo que ocasiona el incremento de IgA2. Se ha reportado que existen rutas de regulación independientes para cada subtipo de IgA (Conley, Albeter & Douglas, 1893).

Una variedad de vacunas administradas por vía parenteral, subcutánea e intradérmica pueden generar la producción de anticuerpos en zonas mucosas. El mecanismo molecular que desencadena tal respuesta no ha sido completamente elucidado. Sin embargo, se considera que antígenos T dependientes administrados

mediante una inmunización sistémica son tomados por células presentadoras de antígeno (APC) en un nódulo linfático cercano al sitio de administración, posteriormente migran al tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) donde activan células B y células T CD4⁺. Por consiguiente, se descarta que los antígenos independientes de células T puedan generar protección en zonas mucosas (Su *et al.*, 2016). Además, se ha comprobado que la vacuna PPV23 no induce inmunidad en mucosas (Pletz *et al.*, 2008).

La información sobre el sitio inductor de células B es importante para establecer la relación con las células productoras de anticuerpos (APC, por sus siglas en inglés) IgA1 e IgA2 en la glándula mamaria. Se ha considerado que las células B maduras productoras de IgA derivadas de MALT; incluyendo el tejido linfoide asociado a intestino (GALT, por las siglas en inglés de 'gut-associated lymphoid tissue') y el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT, por las siglas en inglés de 'nasopharynx-associated lymphoid tissue'), migran a la glándula mamaria justo antes del parto, y en la etapa media y tardía de la lactancia mediante un arreglo compartido de citocinas y moléculas de adherencia (Brandtzaeg, 2010; Wheeler *et al.*, 2007). Lo que indica que los altos niveles de IgA1 e IgA2 reportados en este estudio en mujeres vacunadas y no vacunadas puede deberse a un mecanismo diferente a la sola inducción de anticuerpos por la vacunación.

Un mecanismo plausible que puede explicar los altos niveles de inmunoglobulinas en los calostros analizados es en el que las madres estuvieron en contacto con *S. pneumoniae* en un momento antes del proceso de gestación. La bacteria pudo estar presente en algún sitio anatómico blanco donde pudo colonizar o causar infección, por consiguiente, generó linfocitos B de memoria productores de IgA. Se ha comprobado que con solo la colonización por *S. pneumoniae* se incrementan los niveles de anticuerpos en suero y mucosas que reconocen la cápsula o proteínas de superficie de *S. pneumoniae* (Richards *et al.*, 2010). Posteriormente, después del proceso de vacunación en el periodo de gestación, se generó una respuesta inmunológica por parte de células B maduras a alguno o algunos de los 23 serotipos presentes en la vacuna Pulmovax®, antígenos a los que previamente las madres pudieron haber sido expuestas. Consecuentemente, se pudo ocasionar que las

mujeres vacunadas presentaran una remarcada diferencia en los niveles de IgA1 e IgA2 en calostro a diferencia de sus contrapartes no vacunadas. Por otro lado, la presencia de anticuerpos naturales maternos (mNab, por sus siglas en inglés) con reactividad cruzada, también puede jugar un papel crucial en los niveles de las subclases de IgA reportadas (Zheng *et al.*, 2020). Este posible mecanismo también explica por qué las mujeres no vacunadas durante el proceso de gestación poseen niveles considerables de anticuerpos IgA1 e IgA2 que reconocen algunos de los 23 polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*. Además, el hecho de que las madres en este estudio, con promedio de edad de 27.19 ± 5.2 años, no fueron inmunizadas con la vacuna conjugada PCV7 durante su infancia, favorece tal mecanismo; dado que esta fue implementada en 2006 en México.

Se mantuvieron niveles altos de los subtipos de IgA en mujeres vacunadas, especialmente para los niveles de IgA2 independientemente del tipo de parto (Figura 5). La evaluación del tipo de parto, sin la segregación de los datos por estado de vacunación, solo mostró una diferencia en los niveles de IgA1; siendo las mujeres que se sometieron a un parto vaginal las que presentaron mayores niveles de esta inmunoglobulina. Se ha reportado que el parto por cesárea retrasa el inicio de la lactancia (McDonald *et al.*, 2012; Dewey *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2003), además, su contenido proteico se ve negativamente afectado (Dizdar *et al.*, 2014). La información sobre los niveles de IgA en calostro y leche materna con respecto al tipo de parto no es concluyente, como lo reportado en la literatura. En trabajos previos, se ha observado que el tipo de parto no tiene efecto en las concentraciones de IgA y otros componentes inmunológicos de la leche materna; IgG, IgM y TGF- β (Kulski, Smith, & Hartmann, 1981; Affolter *et al.*, 2016), o no pudo ser determinada (Munblit *et al.*, 2016). Por otro lado, Striker y colaboradores (2004) reportaron un aumento de IgA en muestras de calostro de mujeres que se sometieron a un parto por cesárea, especialmente aquellas mujeres que previa a la cesárea tuvieron un trabajo de parto. En los estudios mencionados se evalúa el efecto del tipo de parto sobre la concentración IgA total, mientras que la evaluación de la concentración de sus subclases, IgA1 e IgA2, puede variar. Además, la evaluación de IgA antígeno específico, igualmente, puede generar resultados diferentes a los reportados con

los niveles totales de IgA. Estudios donde se incluya criterios de inclusión rigurosos y sistemáticamente establecidos, con un énfasis en infecciones previas, deben ser conducidos para establecer el efecto del tipo de parto en los niveles de IgA.

En neonatos, la funcionalidad de los anticuerpos IgA1 e IgA2 provenientes del calostro, que reconocen polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*, es incierta. Un comportamiento similar a lo que ocurre con la IgG de la leche materna en contra de patógenos intestinales puede presentarse (Zheng *et al.*, 2020; Caballero-Flores *et al.*, 2019). Se ha reportado la transferencia de anticuerpos IgG mediante la leche materna de ratones inmunizados contra *Citrobacter rodentium*, los cuales protegen a la descendencia de la infección y posterior muerte causada por este patógeno entérico (Caballero-Flores *et al.*, 2019). Se requiere información sobre el papel del calostro y leche materna en contra de infecciones en las vías respiratorias altas para comprender la acción de las inmunoglobulinas IgA1 e IgA2 en los tejidos blanco de *S. pneumoniae*.

No se presentó una diferencia entre los hospitales de procedencia de los calostros (Figura 7). Esto se pudo haber suscitado debido a que la ubicación de los hospitales se encuentra en la misma zona del país (zona central de México), por consiguiente, las madres pudieron estar expuestas al mismo arreglo de neumococos, dado que los serotipos de *S. pneumoniae* son dependientes al tiempo y zona geográfica (WHO, 2011). La fijeza de los niveles de IgA1 e IgA2 de las muestras con respecto a su origen presento una ventaja para el análisis de los resultados en este trabajo, se pudo obtener una perspectiva del nivel de IgA1 e IgA2 de la población de la zona central del país. Sin embargo, un estudio con muestras de calostro de diferentes hospitales del país podría generar el comportamiento en cuanto a los niveles de las subclases de IgA de la población mexicana.

9 CONCLUSIÓN

Los 113 calostros analizados, provenientes del Hospital de la Mujer, el Hospital 1º de Octubre ISSSTEP y el Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, presentaron mayores niveles de IgA2 que de IgA1 evaluado por los estados de vacunación de las madres; mujeres que fueron vacunadas con la vacuna de 23 polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* durante el periodo de

gestación, y evaluando solo el contenido de cada subclase de IgA. Sin embargo, no se obtuvo un resultado determinante sobre el efecto de tipo de parto en conjunto con el estado de vacunación en los niveles de IgA1 e IgA2. Más estudios sobre el papel de tipo de parto en el contenido de cada subtipo de IgA y la funcionalidad de los anticuerpos IgA en contra de *S. pneumoniae* en el neonato son requeridos para consolidar esquemas de vacunación contra este patógeno durante el periodo de gestación y reforzar la práctica de la lactancia materna, especialmente del calostro, como una forma de prevención de enfermedades infecciosas.

10 REFERENCIAS

- Affolter, M., Garcia-Rodenas, C. L., Vinyes-Pares, G., Jenni, R., Roggero, I., Avanti-Nigro, O., ... Favre, L. (2016). Temporal changes of protein composition in breast milk of Chinese urban mothers and impact of caesarean section delivery. *Nutrients*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/nu8080504>
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Remley, D. T. (1999). Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(4), 525–535. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.4.525>
- Axelsson, I. E., Ivarsson, S. A., & Raiha, N. C. (1989). Protein intake in early infancy: effects on plasma amino acid concentrations, insulin metabolism, and growth. *Pediatric Research*, 26(6), 614–617. <https://doi.org/10.1203/00006450-198912000-00020>
- Aziz, M., Jacob, A., Matsuda, A., & Wang, P. (2011). Review: milk fat globule-EGF factor 8 expression, function and plausible signal transduction in resolving inflammation. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 16(11), 1077–1086. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0630-0>
- Baghdadi, M., Chiba, S., Yamashina, T., Yoshiyama, H., & Jinushi, M. (2012). MFG-E8 regulates the immunogenic potential of dendritic cells primed with necrotic cell-mediated inflammatory signals. *PloS One*, 7(6), e39607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039607>
- Bardanzellu, F., Fanos, V., & Reali, A. (2017). Omics in human colostrum and mature milk: Looking to old data with new eyes. *Nutrients*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/nu9080843>
- Boat, T. F., Kleinerman, J. I., Fanaroff, A. A., & Stern, R. C. (1977). Human tracheobronchial secretions: development of mucous glycoprotein and lysozyme-secreting systems. *Pediatric Research*, 11(9 Pt 1), 977–980. <https://doi.org/10.1203/00006450-197709000-00009>

- Brandtzaeg, P. (2010). The Mucosal Immune System and Its Integration with the Mammary Glands. *Journal of Pediatrics*, 156(2 SUPPL.), S8. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.014>
- Brenna, J. T., Varamini, B., Jensen, R. G., Diersen-Schade, D. A., Boettcher, J. A., & Arterburn, L. M. (2007). Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(6), 1457–1464. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.6.1457>
- Bunker, J. J., & Bendelac, A. (2018). IgA Responses to Microbiota. *Immunity*, 49(2), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.011>
- Bush, C. A., Yang, J., Yu, B., & Cisar, J. O. (2014). Chemical structures of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide type 39 (CPS39), CPS47F, and CPS34 characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy and their relation to CPS10A. *Journal of Bacteriology*, 196(18), 3271–3278. <https://doi.org/10.1128/JB.01731-14>
- Calix, J. J., Porambo, R. J., Brady, A. M., Larson, T. R., Yother, J., Abeygunwardana, C., & Nahm, M. H. (2012). Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27885–27894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380451>
- Chipman, D. M., & Sharon, N. (1969). Mechanism of lysozyme action. *Science (New York, N.Y.)*, 165(3892), 454–465. <https://doi.org/10.1126/science.165.3892.454>
- Chogle, A., Bu, H.-F., Wang, X., Brown, J. B., Chou, P. M., & Tan, X.-D. (2011). Milk fat globule-EGF factor 8 is a critical protein for healing of dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(5–6), 502–507. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00074>

- Clutterbuck, E. A., Lazarus, R., Yu, L. M., Bowman, J., Bateman, E. A. L., Diggle, L., ... Pollard, A. J. (2012). Pneumococcal conjugate and plain polysaccharide vaccines have divergent effects on antigen-specific B cells. *Journal of Infectious Diseases*, 205(9), 1408–1416. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis212>
- Conley, M. E., Arbeter, A., & Douglas, S. D. (1983). Serum levels of IgA1 and IgA2 in children and in patients with IgA deficiency. *Molecular Immunology*, 20(9), 977–981. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(83\)90038-X](https://doi.org/10.1016/0161-5890(83)90038-X)
- Corthésy, B. (2010). Role of secretory immunoglobulin A and secretory component in the protection of mucosal surfaces. *Future Microbiology*, 5(5), 817–829. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.39>
- Das, U. N., & Fams. (2003). Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 19(1), 62–65. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(02\)00852-3](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(02)00852-3)
- Dewey, K. G., Nommsen-Rivers, L. A., Heinig, M. J., & Cohen, R. J. (2003). Risk Factors for Suboptimal Infant Breastfeeding Behavior, Delayed Onset of Lactation, and Excess Neonatal Weight Loss. *Pediatrics*, 112(3), 607 LP – 619. <https://doi.org/10.1542/peds.112.3.607>
- Dizdar, E. A., Sari, F. N., Degirmencioglu, H., Canpolat, F. E., Oguz, S. S., Uras, N., & Dilmen, U. (2014). Effect of mode of delivery on macronutrient content of breast milk. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 27(11), 1099–1102. <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.850486>
- Englund, J. A., & Glezen, W. P. (2003). Maternal immunization with Haemophilus influenzae type b vaccines in different populations. *Vaccine*, 21(24), 3455–3459. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00350-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00350-5)

- Evans, K. C., Evans, R. G., Royal, R., Esterman, A. J., & James, S. L. (2003). Effect of caesarean section on breast milk transfer to the normal term newborn over the first week of life. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 88(5), F380 LP-F382. <https://doi.org/10.1136/fn.88.5.F380>
- Fadlallah, J., El Kafsi, H., Sterlin, D., Juste, C., Parizot, C., Dorgham, K., ... Gorochov, G. (2018). Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. *Science Translational Medicine*, 10(439). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan1217>
- Fomon, S. (2001). Infant feeding in the 20th century: formula and beikost. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 409S-20S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.409S>
- Forsyth, J. S., Willatts, P., Agostoni, C., Bissenden, J., Casaer, P., & Boehm, G. (2003). Long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infant formula and blood pressure in later childhood: follow up of a randomised controlled trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 326(7396), 953. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7396.953>
- GDB Lower Respiratory Infections Collaborators. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Infectious Diseases*, 18(11), 1191–1210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30310-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4)
- Geno, K. A., Gilbert, G. L., Song, Y., Skovsted, I. C., Klugman, K. P., Jones, C., ... Nahm, H. (2015). *Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future*. 28(3), 871–899. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-15>
- Geno, K. A., Saad, J. S., & Nahm, M. H. (2017). Discovery of Novel Pneumococcal Serotype 35D, a Natural WciG-Deficient Variant of Serotype 35B. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(5), 1416 LP – 1425. <https://doi.org/10.1128/JCM.00054-17>

- Girard, L. C., Doyle, O., & Tremblay, R. E. (2017). Breastfeeding, cognitive and noncognitive development in early childhood: A population study. *Pediatrics*, 139(4). <https://doi.org/10.1542/peds.2016-1848>
- Godhia, M., & Patel, N. (2013). Colostrum - Its Composition, Benefits As A Nutraceutical: A Review. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 1(1), 37–47. <https://doi.org/10.12944/crnfsj.1.1.04>
- Goldman, A., Chheda, S. & Keeney, S. E., (2000). Fetal and Neonatal Physiology (3ra). Polin, R. A., Fox, W. W. & Abman, S. H. (Ed.) 2022–2032 Vol. 2 Ch. 184. Philadelphia: Elsevier
- Gonçalves, V. M., Kaneko, K., Solórzano, C., Saleem, I., Miyaji, E. N., Gonçalves, V. M., ... Saleem, I. (2019). Expert Review of Vaccines Progress in mucosal immunization for protection against pneumococcal pneumonia. *Expert Review of Vaccines*, 18(8), 1–12. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1643719>
- Gwaltney, J. M. J., Sande, M. A., Austrian, R., & Hendley, J. O. (1975). Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. II. Relation of transfer of *S. pneumoniae* to incidence of colds and serum antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, 132(1), 62–68. <https://doi.org/10.1093/infdis/132.1.62>
- Hauer, H., Rohrig, K., & Petruschke, T. (1995). Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function. *European Journal of Clinical Investigation*, 25(2), 90–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1995.tb01532.x>
- He, Y., Liu, S., Leone, S., & Newburg, D. S. (2014). Human colostrum oligosaccharides modulate major immunologic pathways of immature human intestine. *Mucosal Immunology*, 7(6), 1326–1339. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.20>

- Healy, C. M. (2012). Vaccines in Pregnant Women and Research Initiatives. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 55(2), 474–486. <https://doi.org/10.1097/grf.0b013e31824f3acb>
- Healy, C. M., & Baker, C. J. (2007). Maternal immunization. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26(10), 945–948. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318156c18c>
- Henriques-Normark, B., & Tuomanen, E. I. (2013). The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(7), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010215>
- Indumathi, S., Dhanasekaran, M., Rajkumar, J. S., & Sudarsanam, D. (2013). Exploring the stem cell and non-stem cell constituents of human breast milk. *Cytotechnology*, 65(3), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9492-8>
- Isaacs, C. E. (2001). The antimicrobial function of milk lipids. In: *Advances in nutritional Research*. Plenum press.
- Jarvinen, K.-M., & Suomalainen, H. (2002). Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergic infants. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 13(4), 243–254.
- Jensen, R. G., Bitman, J., Carlson, S. E., Couch, S. C., Hamosh, M., and Newburg, D. S. (1995). Milk lipids: A. Human milk lipids, in: *Handbook of Milk Composition*. Academic Press.
- 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. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(6), 1251–1257. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70021-7](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70021-7)

- Kelishadi, R., & Farajian, S. (2014). The protective effects of breastfeeding on chronic non-communicable diseases in adulthood: A review of evidence. *Advanced Biomedical Research*, 3(1), 3. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.124629>
- Kilian, M., Mestecky, J., & Russell, M. W. (1988). Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiological Reviews*, 52(2), 296–303.
- Kramer, M. S., Matush, L., Vanilovich, I., Platt, R., Bogdanovich, N., Sevkovskaya, Z., ... Mazer, B. (2007). Effect of prolonged and exclusive breast feeding on risk of allergy and asthma: cluster randomised trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 335(7624), 815. <https://doi.org/10.1136/bmj.39304.464016.AE>
- Kulski, J. K., Smith, M., & Hartmann, P. E. (1981). Normal and caesarian section delivery and the initiation of lactation in women. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 59(4), 405–412. <https://doi.org/10.1038/icb.1981.34>
- Kuntz, S., Kunz, C., & Rudloff, S. (2009). Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *The British Journal of Nutrition*, 101(9), 1306–1315. <https://doi.org/10.1017/S0007114508079622>
- Kusunoki, R., Ishihara, S., Tada, Y., Oka, A., Sonoyama, H., Fukuba, N., ... Kinoshita, Y. (2015). Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in colonic inflammation and carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology*, 50(8), 862–875. <https://doi.org/10.1007/s00535-014-1036-x>
- Ladjeva, I., Peterman, J. H., & Mestecky, J. (1989). IgA subclasses of human colostral antibodies specific for microbial and food antigens. *Clinical and Experimental Immunology*, 78(1), 85–90. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2478328>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1534603>

Laegreid, A., & Kolsto Otnaess, A. B. (1987). Trace amounts of ganglioside GM1 in human milk inhibit enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Life Sciences*, *40*(1), 55–62. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(87\)90252-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90252-9)

Lee, H., Park, H., Ha, E., Hong, Y. C., Ha, M., Park, H., ... Kim, Y. (2016). Effect of breastfeeding duration on cognitive development in infants: 3-year follow-up study. *Journal of Korean Medical Science*, *31*(4), 579–584. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.4.579>

Lesinski, G. B., & Westerink, J. (2001). Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, 1966–1966. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_16987

Lodge, C. J., Tan, D. J., Lau, M. X. Z., Dai, X., Tham, R., Lowe, A. J., ... Dharmage, S. C. (2015). Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, *104*(467), 38–53. <https://doi.org/10.1111/apa.13132>

Lucas, A., Sarson, D. L., Blackburn, A. M., Adrian, T. E., Aynsley-Green, A., & Bloom, S. R. (1980). Breast vs bottle: endocrine responses are different with formula feeding. *Lancet (London, England)*, *1*(8181), 1267–1269. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(80\)91731-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(80)91731-6)

Macpherson, A. J., & Yilmaz, B. (2018). Antibodies that target our intestinal microbes. *Science Immunology*, *3*(23), 3–5. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4037>

Martin, R. M., Gunnell, D., & Smith, G. D. (2005). Breastfeeding in infancy and blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, *161*(1), 15–26. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh338>

- Martin, R. M., Ness, A. R., Gunnell, D., Emmett, P., & Davey Smith, G. (2004). Does breast-feeding in infancy lower blood pressure in childhood? The Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Circulation*, *109*(10), 1259–1266. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000118468.76447.CE>
- McCann, J. C., & Ames, B. N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *82*(2), 281–295. <https://doi.org/10.1093/ajcn.82.2.281>
- McDonald, S. D., Pullenayegum, E., Chapman, B., Vera, C., Giglia, L., Fusch, C., & Foster, G. (2012). Prevalence and predictors of exclusive breastfeeding at hospital discharge. *Obstetrics and Gynecology*, *119*(6), 1171–1179. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318256194b>
- Minniti, F., Comberlati, P., Munblit, D., Piacentini, G., Antoniazzi, E., Zanoni, L., ... Peroni, D. (2014). Breast-Milk Characteristics Protecting Against Allergy. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, *14*(1), 9–15. <https://doi.org/10.2174/1871530314666140121145045>
- Morera-Pons, S., Castellote-Bargalló, A., Campoy-Folgozo, C., & López-Sabater, M. C. (2000). Triacylglycerol composition in colostrum, transitional and mature human milk. *European Journal of Clinical Nutrition*, *54*(12), 878–882. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601096>
- Munblit, D., Sheth, S., Abrol, P., Treneva, M., Peroni, D. G., Chow, L. Y., ... Boyle, R. J. (2016). Exposures influencing total IgA level in colostrum. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, *7*(1), 61–67. <https://doi.org/10.1017/S2040174415001476>

- Musher, D. M. (2003). How contagious are common respiratory tract infections? *The New England Journal of Medicine*, 348(13), 1256–1266. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021771>
- Naarding, M. A., Ludwig, I. S., Groot, F., Berkhout, B., Geijtenbeek, T. B. H., Pollakis, G., & Paxton, W. A. (2005). Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3256–3264. <https://doi.org/10.1172/JCI25105>
- Nakamura, Y., Miyata, M., Ando, T., Shimokawa, N., Ohnuma, Y., Katoh, R., ... Nakao, A. (2009). The latent form of transforming growth factor-beta administered orally is activated by gastric acid in mice. *The Journal of Nutrition*, 139(8), 1463–1468. <https://doi.org/10.3945/jn.109.108761>
- Newburg, D. S., Peterson, J. A., Ruiz-Palacios, G. M., Matson, D. O., Morrow, A. L., Shults, J., ... Pickering, L. K. (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet (London, England)*, 351(9110), 1160–1164. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)10322-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)10322-1)
- Numminen, E., Chewapreecha, C., Turner, C., Goldblatt, D., Nosten, F., Bentley, S. D., ... Corander, J. (2015). Climate induces seasonality in pneumococcal transmission. *Scientific Reports*, 5, 11344. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/srep11344>
- Omer, S. B. (2017). Maternal Immunization. *The New England Journal of Medicine*, 376(13), 1256–1267. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1509044>
- Owen, C. G., Whincup, P. H., Gilg, J. A., & Cook, D. G. (2003). Effect of breast feeding in infancy on blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 327(7425), 1189–1195. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7425.1189>
- Owen, C. G., Whincup, P. H., Kaye, S. J., Martin, R. M., Davey Smith, G., Cook, D. G., ... Williams, S. M. (2008). Does initial breastfeeding lead to lower blood

- cholesterol in adult life? A quantitative review of the evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(2), 305–314. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.305>
- Paton, J. C., & Trappetti, C. (2014). Streptococcus pneumoniae Capsular Polysaccharide. *Microbiol Spectrum*, 241–252. <https://doi.org/10.1128/9781555816513.ch20>
- Peterson, J. A., Hamosh, M., Scallan, C. D., Ceriani, R. L., Henderson, T. R., Mehta, N. R., ... Hamosh, P. (1998). Milk fat globule glycoproteins in human milk and in gastric aspirates of mother's milk-fed preterm infants. *Pediatric Research*, 44(4), 499–506. <https://doi.org/10.1203/00006450-199810000-00006>
- Petruschke, T., Rohrig, K., & Hauner, H. (1994). Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 18(8), 532–536.
- Poolman, J. T., Peeters, C. C. A. M., & van den Dobbelsteen, G. P. J. M. (2013). The history of pneumococcal conjugate vaccine development: dose selection. *Expert Review of Vaccines*, 12(12), 1379–1394. <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.852475>
- Preado, V. (2001). Conceptos microbiológicos de Streptococcus pneumoniae: BASIC MICROBIOLOGICAL ASPECTS. *Revista Chilena de Infectología*, 18, 6–9. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182001000000002>
- Rajani, P. S., Seppo, A. E., & Järvinen, K. M. (2018). Immunologically Active Components in Human Milk and Development of Atopic Disease, With Emphasis on Food Allergy, in the Pediatric Population. *Frontiers in Pediatrics*, 6(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00218>

- Reyes-Gómez, U., López-Cruz, G., Garzón-Sánchez, E., & Colón-Cuesta, F. (2011). Neumococo, Nuevas Actuales y Nuevas Vacunas. *Boletín Clínico Hospital Infantil Del Estado de Sonora*, 28(1), 27–30.
- Richards, L., Ferreira, D. M., Miyaji, E. N., Andrew, P. W., & Kadioglu, A. (2010). The immunising effect of pneumococcal nasopharyngeal colonisation; protection against future colonisation and fatal invasive disease. *Immunobiology*, 215(4), 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.12.004>
- Robbins, J. B., Austrian, R., Lee, C. J., Rastogi, S. C., Schiffman, G., Henrichsen, J., ... Tiesjema, R. H. (1983). Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *The Journal of Infectious Diseases*, 148(6), 1136–1159. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.6.1136>
- Sánchez-Salguero, E., Mondragón-Ramírez, G. K., Alcántara-Montiel, J. C., Cébulo-Vázquez, A., Villegas-Domínguez, X., Contreras-Vargas, V. M., ... Santos-Argumedo, L. (2019). Infectious episodes during pregnancy, at particular mucosal sites, increase specific IgA1 or IgA2 subtype levels in human colostrum. *Maternal Health, Neonatology and Perinatology*, 5(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40748-019-0104-x>
- Sandgren, A., Sjöström, K., Olsson-Liljequist, B., Christensson, B., Samuelsson, A., Kronvall, G., & Normark, B. (2004). Effect of Clonal and Serotype-Specific Properties on the Invasive Capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(5), 785-796. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/30075896>
- Schiffner-Rohe, J., Witt, A., Hemmerling, J., von Eiff, C., & Leverkus, F.-W. (2016). Efficacy of PPV23 in Preventing Pneumococcal Pneumonia in Adults at Increased Risk--A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*, 11(1), e0146338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146338>

- Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., ... Mills, D. A. (2008). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(48), 18964–18969. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809584105>
- Shi, J., Heegaard, C. W., Rasmussen, J. T., & Gilbert, G. E. (2004). Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1667*(1), 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.006>
- Singhal, A., Cole, T. J., Fewtrell, M., & Lucas, A. (2004). Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomised study. *Lancet (London, England)*, *363*(9421), 1571–1578. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16198-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16198-9)
- Stolzer, J. M. (2011). Breastfeeding and obesity: a meta-analysis. *Open Journal of Preventive Medicine*, *01*(03), 88–93. <https://doi.org/10.4236/ojpm.2011.13013>
- Striker, G. A. J., Casanova, L. D., & Nagao, A. T. (2004). [Influence of type of delivery on A, G and M immunoglobulin concentration in maternal colostrum]. *Jornal de pediatria*, *80*(2), 123–128.
- Su, F., Patel, G. B., Hu, S., & Chen, W. (2016). Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *12*(4), 1070–1079. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1114195>
- Timens, W., Boes, A., Rozeboom-Uiterwijk, T., & Poppema, S. (1989). Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *143*(10), 3200–3206.

- Tin Tin Htar, M., Stuurman, A. L., Ferreira, G., Alicino, C., Bollaerts, K., Paganino, C., ... Ansaldi, F. (2017). Effectiveness of pneumococcal vaccines in preventing pneumonia in adults, a systematic review and meta-analyses of observational studies. *PloS One*, *12*(5), e0177985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177985>
- Turrone, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J.-H., Zomer, A., ... Ventura, M. (2010). Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(45), 19514–19519. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011100107>
- Verhasselt, V., Milcent, V., Cazareth, J., Kanda, A., Fleury, S., Dombrowicz, D., ... Julia, V. (2008). Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nature Medicine*, *14*(2), 170–175. <https://doi.org/10.1038/nm1718>
- Victoria, C. G., Bahl, R., Barros, A. J. D., França, G. V. A., Horton, S., Krasevec, J., ... Richter, L. (2016). Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet*, *387*(10017), 475–490. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)
- Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(6), 355–367. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>
- Wheeler, T. T., Hodgkinson, A. J., Prosser, C. G., & Davis, S. R. (2007). Immune components of colostrum and milk - A historical perspective. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *12*(4), 237–247. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9051-7>
- World Health Organization. (2012). *Weekly epidemiological record*. (87), 129–144.

- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., & Ellison, R. T., 3rd (1993). Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and immunity*, 61(2), 719–728.
- Yu, Z.-T., Chen, C., Kling, D. E., Liu, B., McCoy, J. M., Merighi, M., ... Newburg, D. S. (2013). The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology*, 23(2), 169–177. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws138>
- Zheng, W., Zhao, W., Wu, M., Song, X., Caro, F., Sun, X., ... Kasper, D. L. (2020). Microbiota-targeted maternal antibodies protect neonates from enteric infection. *Nature*, 577(November 2018). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1898-4>