

## El beneficio inmunitario de la alimentación al seno materno se ha atribuido en parte a los diversos componentes bioactivos en la leche materna

Reimpreso con permiso de: *Ann Nutr Metab* 2016;69(suppl 2):42 – 51

### Los oligosacáridos de la leche materna influyen en la inmunidad sistémica y de las mucosas neonatales

Por Sharon M. Donovan y Sarah S. Comstock

#### Información clave

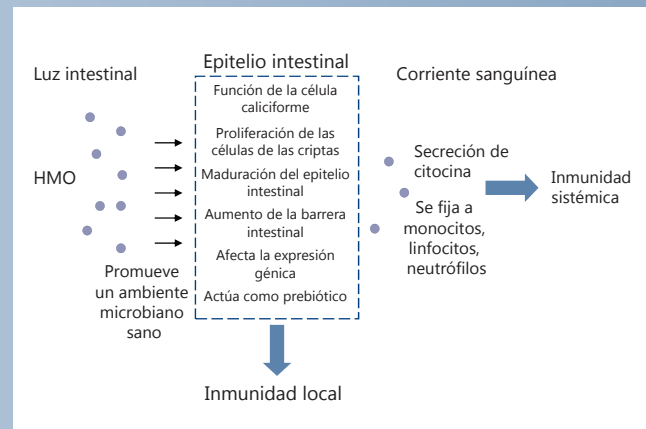
La leche materna confiere múltiples capas de protección al recién nacido al proporcionarle componentes bioactivos que protegen al lactante de infección por patógenos, facilitan el desarrollo intestinal e inmunitario y apoyan los microbios intestinales sanos. Un importante componente bioactivo de la leche materna son los oligosacáridos de la leche materna (HMO, human milk oligosaccharides). Los HMO son una mezcla compleja de hidratos de carbono indigeribles con un alto grado de diversidad estructural y representan uno de los grupos más grandes de componentes activos en la leche materna.

#### Conocimiento actual

Los HMO son una familia de glucanos solubles que están sialilados o fucosilados y proporcionan fuentes de carbono para las especies bacterianas que colonizan a los lactantes alimentados al seno materno. A través de sus acciones sobre el intestino los HMO afectan directa o indirectamente la mucosa de los lactantes y la inmunidad sistémica. En un gran número de estudios se ha demostrado que los HMO influyen en la proliferación y maduración de las células intestinales (como las células de las criptas y las células caliciformes). Además, los HMO modulan la expresión génica en el epitelio intestinal. Todo esto afecta la función de la barrera intestinal, la cual a su vez regula la inmunidad local y sistémica.

#### Implicaciones prácticas

La leche materna contiene una mayor concentración y diversidad estructural, así como grado de fucosilación, en comparación con los oligosacáridos en otras especies, que incluyen la leche de vaca a partir de la cual se derivan las fórmulas infantiles. Los HMO producidos comercialmente son cada vez más fáciles de conseguir y la evidencia indica que la complementación de la fórmula



A través de diversas acciones sobre la función intestinal y el microbioma intestinal los oligosacáridos de la leche materna (HMO) modulan la inmunidad local y sistémica del lactante.

infantil con HMO es segura y benéfica para los lactantes humanos. Existen también posibles aplicaciones de los HMO como tratamientos profilácticos y terapéuticos para quienes están inmunocomprometidos y con un alto riesgo de infección.

#### Lectura recomendada

Kulinich A, Liu L: Human milk oligosaccharides: the role in the fine-tuning of innate immune responses. *Carbohydr Res* 2016;432:62–70.

# Los oligosacáridos de la leche materna influyen en la inmunidad de la mucosa neonatal y la inmunidad sistémica

Sharon M. Donovan<sup>a</sup> Sarah S. Comstock<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciencia de los alimentos y Nutrición Humana, University of Illinois, Urbana, IL, y <sup>b</sup> Departamento de Ciencia de los alimentos y Nutrición Humana, Michigan State University, East Lansing, MI, EUA

## Mensajes clave

- Los oligosacáridos de la leche materna (HMO, *human milk oligosaccharides*) son un componente predominante de la leche materna y están compuestos de diversas estructuras que son neutrales, ácidas y algunas formas son sialiladas o fucosiladas, lo cual contribuye a sus funciones biológicas.
- Los HMO protegen al lactante de las infecciones patógenas, facilitan el establecimiento de la microbiota intestinal, promueven el desarrollo intestinal y estimulan la maduración inmunitaria.
- Algunos tipos de HMO se encuentran ya en el comercio y se agregan a la fórmula infantil solos o en combinación con otros prebióticos

## Palabras clave

Oligosacáridos en la leche materna · Inmunidad · Lactante

## Resumen

El sistema inmunitario del lactante es funcionalmente inmaduro y no ha tenido contacto con antígenos. La leche materna contiene proteínas bioactivas, lípidos e hidratos de carbono que protegen al recién nacido y estimulan el desarrollo inmunitario innato y de adaptación. Esta revisión se enfocará en el papel que desempeñan los oligosacáridos de la leche materna (HMO) en el desarrollo y las funciones del sistema gastrointestinal neonatal y de la in-

munidad sistémica. Durante la última década se ha dirigido investigación intensa a la definición de la complejidad de los oligosacáridos de la leche en muchas especies y se empiezan a delinear sus funciones. En estos estudios se ha demostrado que la leche materna contiene una concentración más alta, así como una mayor diversidad estructural y grado de fucosilación que los oligosacáridos de la leche en otras especies, en particular la leche de bovino, a partir de la cual se producen las fórmulas infantiles. La disponibilidad comercial de grandes cantidades de ciertos HMO ha ampliado nuestra comprensión de las funciones de HMO específicos, las cuales incluyen la protección del lactante de infecciones patógenas, facilitar el establecimiento de la microbiota intestinal, promover el desarrollo intestinal y estimular la maduración inmunitaria. Muchas de estas acciones se ejercen a través de interacciones de hidrato de carbono-hidrato de carbono con los patógenos o células del huésped. En fechas recientes se han agregado 2 HMO a la fórmula infantil, la 2'-fucosilactosa (2'FL) y la lacto-N-neotetraosa (LNnT). Aunque es un primer paso para reducir la brecha de composición entre la leche materna y la fórmula infantil, no está del todo claro si uno o dos HMO resumen la complejidad de las acciones ejercidas por la compleja mezcla de HMO ingerida por los lactantes alimentados al seno materno. Por consiguiente, conforme un mayor número de HMO se comercialice, ya sea aisladas de la leche de bovino o sintetizadas de manera química o microbiológica, se anticipa que se agregarán más oligosacáridos a la fórmula infantil ya sea solos o en combinación con otros prebióticos.

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

## Antecedentes

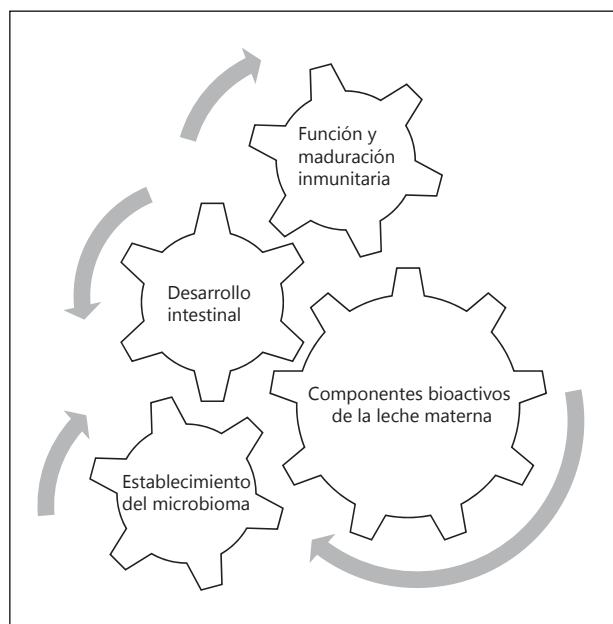
El lactante entra al mundo con un sistema inmunitario funcionalmente virgen que afecta las respuestas tanto de adaptación como las innatas [1], lo cual deja al recién nacido con un alto riesgo de infecciones frecuentes. La maduración inmunitaria posnatal se estimula mediante las exposiciones antigénicas y las interacciones huésped-microbios [1, 2]. La forma y el contenido de aquello con lo que se alimenta al lactante influye en el desarrollo y competencia del sistema inmunitario [3-5]. La leche materna protege al lactante durante este periodo vulnerable al proporcionarle componentes bioactivos que lo protegen de la infección por patógenos, apoyan el desarrollo intestinal, facilitan la tolerancia inmunitaria y alimentan a los microbios intestinales [2-5]. De este modo, la leche materna suministra capas de protección múltiples para el lactante (Figura 1.).

La alimentación al seno materno, en particular la exclusiva, durante 6 meses o más, disminuye la incidencia y/o gravedad de las enfermedades infecciosas, en comparación con la alimentación con fórmula [6]. Muchas enfermedades con componentes de etiología infecciosa e inmunitaria, que incluyen diarrea, infecciones de vías respiratorias y urinarias, otitis media, bacteriemia y enterocolitis necrosante, ocurren con menos frecuencia en los lactantes alimentados con leche materna que en los alimentados con fórmula [6, 7]. También se ha implicado la alimentación al seno materno en la reducción de la incidencia de otras enfermedades que afectan el sistema inmunitario y la tolerancia inmunitaria, como la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celiaca, asma, alergia, diabetes tipo 1, así como las leucemias linfoblástica aguda y mieloblástica aguda [6, 8]. Estos beneficios están mediados, en parte, a través de efectos de la alimentación al seno materno en la microbiota intestinal [8, 9], lo que a su vez estimula la maduración y especificidad de la mucosa neonatal y el sistema inmunitario sistémico [2].

El beneficio inmunitario de la alimentación al seno materno se ha atribuido en parte a los diversos componentes bioactivos que se encuentran en la leche materna [2-5]. Un ejemplo importante es el papel clave de los oligosacáridos de la leche materna (HMO) en la defensa inmunitaria y maduración del recién nacido. Como se describirá a continuación, los HMO están presentes en altas concentraciones en la leche materna, existen con una diversidad estructural increíble, [10-13] confieren protección al huésped y median las respuestas inmunitarias a través de varios mecanismos. [14,15]

## Contenido y composición de los HMO

Los HMO son glucanos solubles complejos, que están presentes en la leche, sobre todo en su forma libre. Estos glucanos se sintetizan a partir de cinco monosacáridos básicos: galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, fucosa y el derivado del ácido siálico, ácido N-acetilneuramínico [10, 11]. Con



**Figura 1.** Es probable que la leche materna orqueste el desarrollo gastrointestinal, inmunitario y de la microbiota. El ecosistema intestinal representa un complejo ambiente interactivo en el cual la leche materna influye en el desarrollo intestinal, el establecimiento de la microbiota intestinal y la maduración del sistema inmunitario de la mucosa intestinal y sistémico. A su vez, las señales de la microbiota estimulan la maduración y especificidad de los sistemas inmunitarios de la mucosa y sistémicos. Además, el sistema inmunitario y la microbiota promueven el desarrollo intestinal. La leche materna contiene nutrientes bioactivos y otros componentes que son moduladores de estos procesos, de los cuales los oligosacáridos son un componente clave.

pocas excepciones, todos los HMO llevan lactosa ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ) en el extremo reductor, el cual se alarga en unión  $\beta 1-3$  o  $\beta 1-6$  mediante dos diferentes disacáridos, ya sea  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$  (cadena tipo 1) o  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$  (cadena tipo 2) [11].

Se ha informado que el contenido de HMO se encuentra en el rango de 1 a 10 g/L en la leche madura y 15 a 23 g/L en el calostro [10-13]. En la leche materna de término, ~ 35 a 50% de los HMO es fucosilado, 12 a 14% es sialilado y 42 a 55% es HMO neutral no fucosilado (Cuadro 1) [10-13]. Sin embargo, la composición de los HMO está influenciada por la genética materna, que incluye el estado secretor y el grupo sanguíneo de Lewis [10,11]. La fucosilación del HMO está mediada por las dos fucosiltransferasas FUT2 (gen secretor) y FUT3 (gen de Lewis). Las madres no secretoras, que carecen de una enzima FUT2 funcional y representan cerca de 30% de las mujeres en el mundo entero, producen leche que carece de oligosacáridos  $\alpha 1-2$ -fucosilados, como 2'-fucosilactosa (2'FL) y lacto-N-fucopentosa (LNFP) I [10, 11]. La ausencia de estos compuestos tiene consecuencias funcionales. Por ejemplo, los lactantes que consumen leche producida

**Cuadro 1.**  
Concentraciones de los principales HMO en la leche materna [10-13]

Categorías de HMO (% del total)	Oligosacárido	Concentración promedio (rango), g/L
Fucosilado (35 a 50%)	2'FL	2.7 (1.88 a 4.9)
	3'FL	0.5 (0.25 a 0.86)
	LNFP I	0.122 (0.106 a 0.145)
	LNFP II + III	0.156 (0.120 a 0.161)
Sialilado (12 a 14%)	3'SL	0.2 (0.1 a 0.3)
	6'SL	0.5 (0.2 a 1.22)
Neutral no fucosilado (42 a 55%)	LNnT	0.3 (0.17 a 0.45)

2'FL, 2'-fucosil-lactosa; 3'SL, 3'-sialil-lactosa; 6'SL, 6'-sialil-lactosa; HMO, oligosacáridos de la leche materna (*human milk oligosaccharides*); LNFP, lacto-N-fucopentaosa; LNnT, lacto-N-neotetraosa.

por mujeres que no son secretoras presentan una colonización retardada de bifidobacterias, una mayor abundancia de taxa *Streptococcus*, y tienen diferencias funcionales en la actividad metabólica de su microbiota [16]. Los lactantes alimentados de leche proveniente de madres no secretoras tienen mayor riesgo de enfermedades diarreicas [17].

### Los HMO y el microbioma

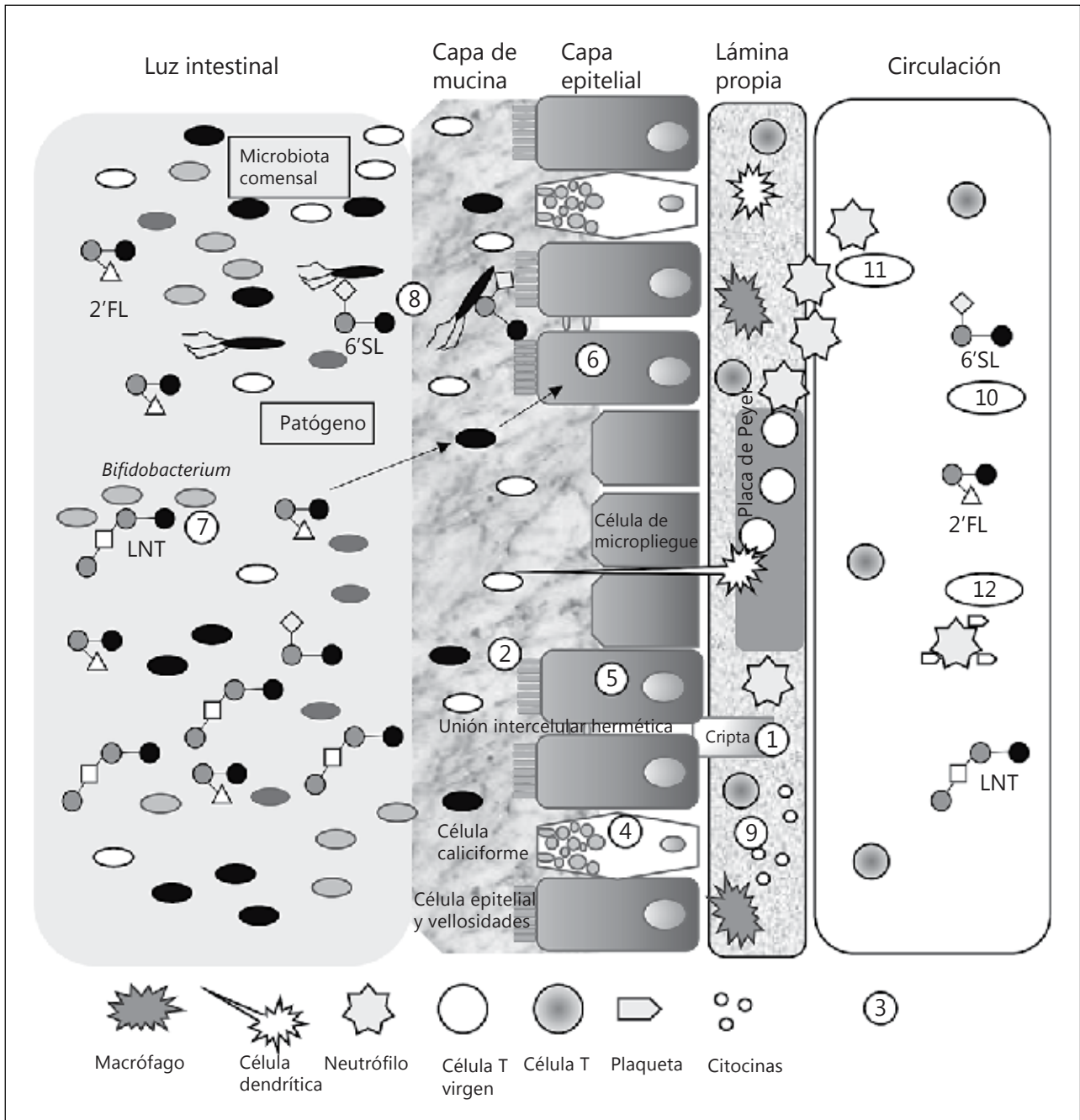
El desarrollo del microbioma intestinal del lactante es un proceso secuencial que empieza y continúa durante los primeros 2 a 3 años de vida. La composición y diversidad microbiana se forma por la genética del huésped y múltiples factores ambientales, de los cuales la dieta es un contribuyente importante [8, 9]. En los estudios realizados durante la última década se ha mostrado que las especies específicas de *Bacteroides* y *Bifidobacterium* que colonizan con frecuencia a los lactantes alimentados al seno materno, utilizan de manera efectiva los HMO como fuente de carbono. Esto es particularmente cierto de *B. longum* ssp. *Infantis* (*B. infantis*), el cual es un microbio predominante del intestino en la mayoría de los lactantes alimentados al seno materno [18]. El descubrimiento de una isla genómica en *B. infantis* que codifica enzimas específicas para el metabolismo de HMO apoya una adaptación de esta especie al medio intestinal del lactante amamantado [18, 19]. En efecto, en un estudio reciente en lactantes alimentados al seno materno complementado con 2'FL 81 g/L y LNnT (0.5 g/L) se demostró que la composición global de la microbiota de los lactantes alimentados con fórmula con 2'FL y LNnT era significativamente diferente de la de los lactantes alimentados con fórmula no complementada ( $p < 0.001$ ), en el nivel de género y más cercana a la de los lactantes alimentados al seno materno a los 3 meses de edad [20]. Además, *Bifidobacterium* era más abundante ( $p < 0.01$ ), mientras que *Escherichia* y *Peptostreptococcaceae* no clasificados eran menos abundantes en los lactantes alimentados con fórmula con 2'FL y LNnT en comparación con los lactantes alimentados con fórmula no complementada, y estas concentraciones eran más cercanas a las observadas en los lactantes alimentados al seno materno [20]. Asimismo, las concentraciones de varios metabolitos importantes en las

heces (propionato, butirato y lactato eran más similares a los de los lactantes alimentados al seno materno [20]).

En ocasiones previas, se ha demostrado que la fermentación de los HMO mediante microbiota de cerdo recién nacido producía ácidos grasos de cadena corta y promovían el crecimiento de bacterias benéficas *in vitro* [21] e *in vivo* [22]. Las bacterias del intestino y la respuesta inmunitaria, en particular la gastrointestinal, están interrelacionadas en forma estrecha [23]. Así, en este modelo animal, los cambios inducidos por los HMO en las poblaciones bacterianas del intestino de cerdos alteraría el curso de una infección intestinal [24], la cual a su vez alteraría la respuesta inmunitaria [22]. Alternativamente, el cambio en las bacterias intestinales afectaría directamente el sistema inmunitario de estos animales [2]. En la siguiente sección se resumen formas adicionales por las cuales los HMO median la inmunidad del recién nacido.

### Los HMO como inmunomoduladores

En la Figura 2 se resumen los resultados de un cuerpo de evidencia acumulado que muestra que los HMO influyen e manera directa e indirecta la función inmunitaria de la mucosa y sistémica del lactante. En general, la salud intestinal y la función de barrera se consideran como la primera línea de defensa en la inmunidad innata. La proliferación celular se lleva a cabo en las criptas, y las células se diferencian conforme emigran hacia arriba por el eje de las criptas vellosas, con excepción de las células de Paneth, que migran hacia abajo hasta la base de la cripta. Los HMO reducen la proliferación de células de las criptas intestinales [25, 26], aumentan la maduración celular [26], y aumentan la función de barrera [26] (indicado con 1 al 3 de la figura 2). Una capa formada por glucoproteínas mucosas o mucinas producidas por las células caliciformes actúa como lubricante y una barrera física de protección entre el epitelio intestinal y el contenido de la luz intestinal (indicada por 4 en la figura 2). Los HMO influyen la función de la célula caliciforme, como se ha mostrado para los galacto-oligosacáridos (GOS) [27]. Los HMO afectan la expresión génica inmunitaria epitelial en forma tanto directa [28-30] como indirecta a través de la microbiota [31]



**Figura 2.** Posibles mecanismos por medio de los cuales los oligosacáridos de la leche materna (HMO) influyen la función inmunitaria del huésped. HMO afecta la inmunidad innata a través de la barrera epitelial; el HMO reduce la proliferación de la célula de la cripta (1), aumenta la maduración de las células intestinales (2), aumenta la función de barrera (3) y es posible que influya en la función de la célula caliciforme (4), como se ha demostrado para los galacto-oligosacáridos. Además, los HMO afectan la expresión génica inmunitaria epitelial tanto en forma directa (5) como indirecta a través de la microbiota (6). Los HMO sir-

ven como prebióticos para promover el crecimiento de bacterias sanas, que incluyen las especies *Bifidobacterium* y *Bacteroides* (7), y los HMO inhiben las infecciones por bacterias y virus, ya sea fijándolos en la luz intestinal o mediante la inhibición de la fijación a los receptores glicanos de la superficie celular (8). Los HMO afectan las poblaciones de células inmunitarias y la secreción de citocina (9). Los HMO se absorben también hacia la sangre (10), en donde afectan la fijación de monocitos, linfocitos y neutrófilos a las células endoteliales (11) y la formación de complejos plaqueta-neutrófilo (12).

(indicado con 5 y 6 en la figura 2, respectivamente). Como se observó antes, los HMO sirven como prebióticos para promover el crecimiento de bacterias sanas que incluyen los géneros *Bifidobacteria* y *Bacteroides* [32] (indicado con 7 en la Figura 2) y los HMO inhiben las infecciones por bacterias y virus, ya sea fijando al patógeno en la luz intestinal o al inhibir su fijación a los receptores glucanos de la superficie celular [14-15, 22] (indicado con 8 en la figura 2). Además, los oligosacáridos dietéticos enriquecen el revestimiento intestinal con lo que contribuyen al repertorio de glucanos intestinales [33]. Los HMO contribuyen también a la función de barrera epitelial al apoyar el crecimiento de *B. infantis* en el intestino del lactante [10, 18]. *B. infantis* produce péptidos que se ha demostrado, en un modelo murino de colitis, que normalizan la permeabilidad intestinal a través del aumento de la expresión de proteínas de la unión intercelular hermética [34]. Es probable que los HMO apoyen otras especies bacterianas que son importantes para el mantenimiento de la integridad intestinal. Estos cambios en la función de barrera intestinal alterarían a su vez el sistema inmunitario tanto local como sistémico [35]. Los HMO afectan las poblaciones de células inmunitarias y la secreción de citocina [22, 36] (indicado con 9 en la Figura 2). Algunos HMO se absorben también hacia el torrente sanguíneo [37-39] (indicado con 10 en la Figura 2), en donde ejercen efectos sistémicos al unir a los monocitos, linfocitos y neutrófilos con las células endoteliales [40] (indicado con 11 en la Figura 2) y la formación de complejos plaquetas-neutrófilo [41] (indicado con 12 en la Figura 2). Se remite al lector a una revisión reciente de Kulinich y Liu [15] para un análisis adicional de este tema.

### Fijación de hidratos de carbono como un posible mecanismo de los HMO en el sistema inmunitario

Los hidratos de carbono y las proteínas fijadoras de hidratos de carbono desempeñan un papel importante en las respuestas inmunitarias. Las células tienen firmas únicas de glicanos, hechas a partir de combinaciones de unidades de glicanos específicos que participan cuando una célula se pone en contacto con otra célula u otros componentes de su ambiente [42,43]. Sin embargo, muchas de las unidades de glicanos que se encuentran en las células de los mamíferos se encuentran también en los microbios y en los alimentos, entre los que se incluye la leche materna. Estas similitudes proporcionan oportunidades para interacciones huésped-microbio-HMO.

Las lectinas son proteínas fijadoras de hidratos de carbono sobre las superficies de las células de mamíferos que convierten el reconocimiento de unidades específicas y la presentación espacial de esas unidades, en acción. Las lectinas se agrupan según sus dominios de reconocimiento de hidrato de carbono (CRD, *carbohydrate recognition domains*) [42, 43]. Existe por lo menos una docena de CRD

identificadas en los mamíferos, aunque son tres las clases de lectinas relacionadas con la influencia de los HMO en las respuestas inmunitarias, éstas son: lectinas de tipo-C, lectinas semejantes a Ig fijadoras de ácido siálico o siglecs (*Sialic acid-binding Ig-like lectins*), y galectinas.

Las lectinas tipo C requieren de calcio para funcionar e incluyen selectinas, lectina fijadora de manosa y, la no integrina que engancha una molécula de adhesión 3 intercelular, específica de la célula dendrítica (DC-SIGN, *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin*). Los receptores de lectina tipo C sobre la superficie de las células dendríticas (DC, *dendritic cells*) determinan si la célula inducirá tolerancia en vez de activación del linfocito [44]. La DC-SIGN, reviste interés particular con respecto a los mecanismos por los cuales los HMO influyen en la inmunidad debido a que tiene un CRD específico para unidades de fucosa. Además, las células del tubo digestivo de los lactantes expresan DC-SIGN [45]. Es muy probable que estas células intestinales sean células presentadoras de antígeno, en específico DC [43]. Aunque las interacciones entre los ligandos fucosilados y DC-SIGN contribuyen a la tolerancia inmunitaria, la respuesta celular depende al final de otras reacciones ligando-receptor que ocurren en forma simultánea [43].

Las siglecs son lectinas fijadoras de ácido siálico que se encuentran con más frecuencia sobre subgrupos de células inmunitarias [46]. Existen por lo menos 16 siglecs expresadas por diferentes poblaciones de leucocitos, entre las que se incluyen sialoadhesina (siglec-1), CD22 (siglec-2), glucoproteína relacionada con la mielina (MAG, siglec-4), siglec-15 y siglecs relacionadas con CD33. La especificidad de las siglecs se deriva de las diferencias en los sitios de unión secundarios [43]. Las siglecs son receptores de superficie de células endocíticas que transportan cargamento entre la superficie celular y las vesículas intracelulares; estos receptores se expresan principalmente en las células implicadas en el procesamiento y presentación de antígenos [43]. Asimismo, las moléculas que contienen ácido siálico pueden entrar a los macrófagos al unirse a siglecs en la superficie celular [46]. En las células de los mamíferos, algunos glicanos que contienen ácido siálico funcionan como patrones moleculares autoasociados y evitan las respuestas inmunitarias a estímulos no patógenos. La ligadura de siglecs particulares estimula la producción de la citocina inmunoreguladora, interleucina-10 (IL-10) [47].

Las galectinas son importantes para el recambio celular y la regulación inmunitaria. El CRD de las galectinas es específico para los  $\beta$ -galactósidos. Cuando las células están desialiladas, aumenta la densidad de las mitades de galactosa expuestas sobre la superficie celular. Por ejemplo, las células T vírgenes expresan CD45 con un ácido siálico unido en  $\alpha$ -2,6. La cantidad de ácido siálico unido en  $\alpha$ -2,6 se reduce tras la activación de la célula T. La disminución del ácido siálico unido a  $\alpha$ -2,6 hace que las células T activadas sean susceptibles de apoptosis me-

**Cuadro 2.** Criterios de valoración relacionados con inmunidad de los estudios de alimentación con HMO

Especies	Diseño del estudio	Hallazgos importantes	Ref.
Lactantes humanos	Lactantes sanos producto de embarazo único, incluidos en el quinto día de vida y alimentados con fórmulas hasta los cuatro meses de edad – Alimentado al seno materno – Fórmula + 2.4 g/L GOS – Fórmula + 2.2 g/L GOS + 0.2 g/L 2'FL – Fórmula + 1.4 g/L GOS + 1.0 g/L 2'FL PBMC aisladas a las 6 semanas de edad	Los lactantes alimentados al seno materno y los alimentados con cualquiera de las fórmulas con 2'FL fueron similares y tuvieron un menor número de citocinas inflamatorias plasmáticas que los lactantes alimentados con la fórmula de control. En cultivos <i>ex vivo</i> de PBMC estimuladas con RSV, las células de los lactantes alimentados al seno materno no fueron diferentes de las de los grupos alimentados con fórmula con 2'FL, aunque secretaron menos TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ y una tendencia a tener menos IL-1Ra, IL-6 e IL-1 $\beta$ que las células provenientes de lactantes de rata alimentados con la fórmula control	53
Lactantes humanos	Lactantes sanos producto de embarazo único, incluidos en el decimocuarto día de vida y alimentados con fórmula experimental a los seis meses de edad, y fórmula de seguimiento estándar a los 12 meses – Fórmula – Fórmula + 1.0 g/L 2'FL + 0.5 g/L LNnT	Los lactantes alimentados con fórmula complementada con HMO tuvieron un número significativamente menor de informes de los padres de: – Bronquitis hasta los 4, 6, y 12 meses – Menos infección de vías respiratorias hasta los 12 meses – Uso de antipiréticos hasta los 4 meses – Uso de antibióticos hasta los 6 y 12 meses	54
Lechones privados de calostro	Estudio de alimentación de 15 días – Fórmula – Fórmula + 4 g/L HMO (40% 2'FL; 35% LNnT; 10% 6'SL; 5% 3'SL; 10% SA libre) Infectados con cepa OSU de RV en el día 10 y analizados el día 15	HMO provocó una duración más corta de la diarrea y una mayor expresión del IFN- $\gamma$ ileal y el IL-10 mRNA que la fórmula, pero concentraciones similares de IgG e IgM específicas para RV como con la fórmula	22
Ratones C57BL/6 hembra adulta	Modelo de infección por <i>E. coli</i> – 0.25% DSS por vía oral durante los días 0–3 – 2'FL (100 mg o vehículo a través de sonda oral los días 0–4) – 20 mg estreptomina mediante sonda oral en el día 4 Infectado con AIEC en el día 5 y analizado en el día 9	2'FL evitó la pérdida de peso y redujo la colonización de AIEC, inflamación del colon, expresión de CD14 de las células de la cripta y de IL-6, IL-17, y producción de TNF- $\alpha$ en respuesta a la infección con AIEC	29
Ratones Balb/c macho adulto	Modelo de tratamiento para alergia a alimento – Sensibilizado IP a OVA – 2 semanas después (día 27), alimentación por sonda oral, diario (1 mg en 200 mL PBS) 2'FL 6'SL Lactosa – Provocación oral el día 28 con OVA (50 mg) cada 3 días hasta el día 43	2'FL y 6'SL atenuaron la diarrea y la hipotermia inducida por la provocación con OVA, reducción del número de células cebadas intestinales y anafilaxia cutánea pasiva, y aumento de las células T reguladoras de las placas de Peyer y CD11c+CD103+ DC 6'SL aumentó la IgG2a específica de OVA y las células T reguladoras MLN Los esplenocitos de ratones tratados con 6'SL produjeron más IFN- $\gamma$ e IL-10 pero menos TNF Los esplenocitos provenientes de ratones tratados con 2'FL produjeron menos IFN- $\gamma$	51

2'FL, 2'-fucosilactosa; 3'SL, 3'-sialilactosa; 6'SL, 6'-sialilactosa; AIEC, *E. coli* adherente invasiva (*adherent-invasive E. coli*), DC, (células dendríticas, *dendritic cells*, por sus siglas en inglés); DSS, sulfato de sodio dextrán (*dextran sodium sulfate*, por sus siglas en inglés); GOS, galacto-oligosacáridos; HMO, oligosacáridos de leche materna (*Human milk oligosaccharides* por sus siglas en inglés); IFN, interferón; IP, Infección intraperitoneal; Ig, inmunoglobulina; IL, interleucina; LNnT, lacto-N-neotetraosa; MLN, ganglios linfáticos mesentéricos (*mesenteric lymph nodes*, por sus siglas en inglés); OSU, Ohio State University; OVA, ovalbúmina; PBMC, células mononucleares en sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, por sus siglas en inglés); PBS, solución salina amortiguada con fosfato (*phosphate-buffered saline*, por sus siglas en inglés); RSV, virus sincicial respiratorio (*respiratory syncytial virus*, por sus siglas en inglés); RV, rotavirus; SA, ácido siálico (*sialic acid*, por sus siglas en inglés); TNE, factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*, por sus siglas en inglés).

diada por galectina-1 [48]. De ahí que es posible que la fijación de los HMO sialilados a las células evite la apoptosis.

### Los HMO como moduladores de la inmunidad de la mucosa

Se han utilizado líneas celulares intestinales para determinar los efectos de los HMO sobre la expresión génica

relacionada con la inmunidad y la producción de proteínas. Estas células se han incubado junto con oligosacáridos [28], bacterias [48] o lipopolisacáridos (LPS) para hacer un modelo de infección bacteriana [29]. La incubación concurrente de *Bifidobacterium* con células de la línea de células intestinales Caco-2 y HMO provocó una disminución de los genes de células intestinales relacionados con actividad de quimiocina en comparación con la incubación concurrente

con glucosa o lactosa [29]. Por el contrario, en ausencia de un coestimulante bacteriano, los HMO aumentaron la expresión de varias quimiocinas de la línea celular HT-29 [28]. Trabajos adicionales en las líneas celulares intestinales T84 y HCT8 mostraron que las mezclas complejas de HMO así como 2'FL redujeron los signos distintivos de inflamación intestinal [29].

Se ha demostrado que los HMO afectan el curso de una infección viral gastrointestinal. En un modelo de infección aguda por rotavirus (RV) en donde se aisló *in situ*, un ileón de lechón de 21 días de nacido, las asas intestinales tratadas con HMO y RV tuvieron una reducción en la expresión del mRNA de la proteína no estructural-4 (NSP-4, *non-structural protein-4*, por sus siglas en inglés), lo que indicó que HMO redujo la replicación del RV [49]. Sin embargo, la expresión de la citocina y quimiocina intestinales no se vio afectada. Tanto los HMO neutrales como los ácidos disminuyeron la expresión de mRNA intestinal en el modelo *in situ*, mientras que sólo el HMO ácido inhibió de manera efectiva la infectividad del RV en un modelo *in vitro* [49].

### Los HMO como moduladores de la inmunidad sistémica y la protección de la infección

En el plasma de lactantes alimentados al seno materno se detectan HMO en concentraciones de 1 a 133 mg/L [37, 39], lo que indica el potencial del HMO dietético para afectar en forma directa las células inmunitarias que circulan en la sangre. Como se analizó en párrafos anteriores, muchos de los receptores inmunitarios reconocen las estructuras de oligosacáridos de sus ligandos glucoproteicos [14, 15]. Debido a que un subgrupo de HMO es estructuralmente semejante a los ligandos de selectina [14] es probable que el HMO se fije directamente a las células inmunitarias y desencadene la señalización que provoca los cambios en las poblaciones de células inmunitarias y sus funciones. Por ejemplo, las selectinas P y E reconocen el sialil-Lewis x (sLeX), una mitad de glicano de varios HMO [11]. Además, la fucosilación y sialilación, dos modificaciones enzimáticas frecuentes en los HMO, permiten la fijación de selectinas [50]. La alteración, inducida por HMO, de las interacciones proteína-hidrato de carbono reducen el ondulado [40] y activación [41] de los neutrófilos. Los HMO afectan en forma directa la proliferación de las células inmunitarias y la producción de citocina en experimentos *ex vivo* con células mononucleares en sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*, por sus siglas en inglés) provenientes de cerdos recién nacidos [36]. La estimulación del HMO aislado estimuló la producción de la citocina reguladora IL-10 [36]. Otros observaron que el HMO ácido induce la producción de IL-10; además encontraron que el HMO ácido induce el IFV- $\gamma$  proveniente de células mononucleares estimuladas, en sangre del cordón humano *ex vivo* [45]. Los HMO aislados aumentaron la proliferación de PBMC estimuladas con mitógeno de célula T, fitohemaglutinina (PHA,

*phytohemagglutinin*, por sus siglas en inglés) y HMO sialilado aumentaron la proliferación de PBMC estimuladas con el mitógeno LPS de células B [36]. En contraste 2'FL inhibieron la proliferación del cultivo de PBMC durante tres días. Así, la respuesta del HMO tal vez dependa del estado del lactante. En el estado no estimulado, el HMO disminuye la proliferación, mientras que el HMO aumenta la proliferación en respuesta a un estímulo mitógeno.

Hasta la fecha, muy pocos estudios han alimentado y analizado los criterios de valoración inmunitarios [22, 29, 30, 51-54] (Cuadro 2). Los lechones [55] se han alimentado con 2'FL, pero sólo se informó sobre los criterios de valoración del crecimiento y toxicología. Un artículo de reciente publicación describió los resultados inmunitarios en lactantes humanos alimentados con fórmula que contenía 2.4 g/L GOS, 2.2 g/L GOS + 0.2 g/L 2'FL, o 1.4 g/L GOS + 1.0 g/L 2'FL, en comparación con controles de referencia alimentados al seno materno [53]. Se alimentó a los lactantes con la fórmula desde los cinco días hasta los cuatro meses de edad, y se obtuvieron muestras de sangre a las seis semanas de edad para análisis de citocinas, fenotipado de células inmunitarias y estimulación *ex vivo* de PBMC aisladas.

Los lactantes alimentados al seno materno y los alimentados con cualquiera de las fórmulas con 2'FL eran similares y tenían menos citocinas inflamatorias plasmáticas que los lactantes alimentados con la fórmula control. Además, la secreción de citocina de las PBMC provenientes de los lactantes alimentados al seno materno y los lactantes alimentados con cualquiera de las fórmulas que contenían 2'FL que se estimularon *ex vivo* con virus sincicial respiratorio fue similar y secretaron menos factor de necrosis tumoral  $\alpha$  e interferón  $\gamma$  y una tendencia a tener menor IL-1RA, IL-6 e IL-1 $\beta$  que las células provenientes de lactantes alimentados con la fórmula control [53].

En otro estudio reciente en lactantes humanos se evaluó el efecto de la fórmula complementada tanto con 2'FL (1.0 g/L) como LNnT (0.5 g/L) se compararon con una fórmula sin complemento. Los lactantes recibieron la fórmula desde los 14 días hasta los seis meses de edad. Después de los cuales cambiaron a fórmula de seguimiento estándar y siguieron hasta los 12 meses de edad. Los lactantes alimentados con fórmula complementada HMO tuvieron significativamente menos informes de los padres sobre: bronquitis hasta los cuatro meses (2.3 vs. 12.6%), seis meses (6.8 vs. 21.8%), y 12 meses (10.2 vs. 27.6%); infección de vías respiratorias inferiores (conjunto AE) hasta los 12 meses (19.3 vs. 34.5%); uso de antipiréticos hasta los cuatro meses (15.9 vs. 29.9%); y uso de antibióticos hasta los seis meses (34.1 vs. 49.4%) y 12 meses (42.0 vs. 60.9%) en comparación con los alimentados con la fórmula estándar [54].

Varios estudios en modelos animales apoyan la incidencia disminuida de infección en los lactantes humanos alimentados con fórmula con HMO. En los ratones infectados con *Escherichia coli*, la administración oral por sonda con 100 mg diarios, 2'FL evitó la pérdida de peso corporal y redujo la co-



lonización con *E. coli* adherente invasiva, la inflamación del colon, la expresión de células CD4 en las criptas, así como la producción de IL-6, IL-7 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  en respuesta a la infección por *E. coli* adherente invasiva, en comparación con los ratones tratados con vehículo [29]. Los ratones alimentados con 2'FL y sujetos a resección ileocecal aumentaron más de peso y tuvieron una mayor profundidad de las criptas y altura de las vellosidades en el sitio de corte en comparación con los ratones sin complementación [30]. Los estudios en los que los cerdos y lactantes humanos se alimentaron con HMO se han enfocado en 2'FL, el cual es fácil de conseguir en grandes cantidades con un costo razonable y se ha mostrado que los oligosacáridos fucosilados alimentan clases específicas de bacterias durante los eventos inflamatorios intestinales [56]. Dado lo que se sabe acerca de los efectos de otros HMO, estos compuestos también deben utilizarse en los estudios de alimentación cuando se disponga en suficientes cantidades.

Sólo un estudio *in vivo* utilizó una mezcla compleja de HMO y evaluó los criterios de valoración inmunitarios. En ese informe, los cerdos recién nacidos alimentados con una dieta que contenía 4 g/L HMO, que consistía en 40% 2'FL, 10% 6'-sialyllactosa (6'SL), 35% lacto-N-neotetraosa (LNnT), 5%, 3'-sialyllactosa (3'SL) y 10% de ácido siálico libre, tuvieron una menor duración de la diarrea, en respuesta a la infección por RV con  $48.8 \pm 9.8$  h *versus*  $80.6 \pm 4.5$  h en los cerdos alimentados con fórmula no complementada [22]. El tejido ileal de los cerdos alimentados con HMO contenía más IFN- $\gamma$  (producido por las células Th1) e IL-10 (una citocina antiinflamatoria) mRNA en comparación con el que provenía de los cerdos alimentados con fórmula [22].

En un modelo murino de alergia a alimentos, se administró 2'FL y 6'SL a través de sonda oral se redujeron los síntomas en ratones sensibilizados a ovoalbúmina, una proteína del huevo [51]. Específicamente, los esplenocitos estimulados con ovoalbúmina, provenientes de ratones tratados con 6'SL produjeron más IL-10 y menos IFN- $\gamma$  que los que provenían de ratones no tratados. Además, los ratones tratados con 2'FL o 6'SL tuvieron un mayor número de células inmunitarias reguladoras en sus tejidos inmunitarios intestinales que los ratones no tratados. Es interesante que, ni 2'FL ni 6'SL afectaron las células T reguladoras cuando se administraron a ratones no sensibilizados [51]. Esto ejemplifica la necesidad de identificar un modelo con provocación adecuada para evaluar los efectos de los compuestos dietéticos en el sistema inmunitario. En los ratones, los oligosacáridos de la leche LNFP III y LNnT tienen preferencia por Th2 y suprimen las respuestas Th1 [57]. En fechas recientes, se ha informado que los lactantes alimentados al seno materno con concentraciones bajas de LNFP III ( $< 60$  mCM) tuvieron una probabilidad 6.7 veces mayor (IC 95% 2.0 a 22) de presentar alergia a la leche de vaca cuando se compararon con

los lactantes que recibieron leche con concentraciones altas de LNFP III [58].

Otra estrategia utilizando ratones *knockout* mostraron que los compuestos que contenían SL afectan en forma directa la inmunidad de la mucosa gastrointestinal [52, 59]. En un estudio, la presencia de 3'FL en la leche, aumentó el número de células inmunitarias infiltrando el intestino en ratones sin IL-10 [52]. Además, la complementación con 3'FL aumentó la gravedad de la colitis en los ratones recién nacidos sin IL-10 ni St3gal4 (la enzima que sintetiza 3'SL), y que si cruzaban ratones naturales con madres deficientes se reducía la gravedad de la colitis. Un inconveniente de este trabajo es que se realizó en ausencia de producción de IL-10, mientras que otros estudios *in vivo* han demostrado que algunos HMO aumentan la IL-10 intestinal [22, 51]. 3'SL es un producto de varias bacterias patógenas [60] y la conformación (enlace  $\alpha$ 2,3-entre el ácido siálico y la galactosa) en las bacterias patógenas y en la leche materna es la misma. DC reconoce el 3'SL y genera una respuesta inmunitaria a través de la vía de señalización TLR4 [61]. Estos resultados indican que la presencia de 3'SL aumenta la respuesta inflamatoria a través de efectos directos sobre DC. Cuando TLR4 estaba ausente, 3'SL fue menos efectivo al inducir la activación de DC. Sin embargo, esos DC demostraron también un aumento mínimo en la expresión de CD40 lo que indica que, en DC, existe por lo menos otro mecanismo de sensibilidad 3'SL, aunque mucho menos eficiente que la vía TLR4. TLR4 es el receptor para LPS de *E. coli*. Otro vínculo entre 3'SL y TLR4 se explica en un artículo más nuevo, en donde se demuestra que 3'SL estimula la proliferación intestinal de la población de *E. coli* y que esta proliferación de *E. coli* es responsable de la exacerbación de colitis por sulfato de sodio dextrán a través de la liberación de citocinas proinflamatorias desde DC intestinal [62]. Estos ejemplos demuestran la complejidad de las relaciones entre los oligosacáridos, las bacterias intestinales y el sistema inmunitario.

## Conclusión

La gran diversidad de HMO tiene el potencial de modular la inmunidad tanto innata como la neonatal adaptativa. Los hallazgos de los experimentos *in vitro* y los modelos animales muestran que los HMO interactúan en forma directa con las células epiteliales del tubo digestivo, así como con las células inmunitarias de la mucosa y sistémicas para modular la función inmunitaria. Los HMO también dan forma de manera benéfica al microbioma del lactante alimentado al seno materno. El aumento de disponibilidad de los HMO en fuentes comerciales, así como la evidencia acumulada que demuestra que la fórmula complementada con HMO es segura y confiere beneficios para los lactantes humanos ha llevado a la adición reciente de 2'FL solo o en combinación con LNnT a la fórmula infantil. Además, debido a sus

efectos benéficos en la función inmunitaria y la defensa del huésped, los HMO tal vez sean benéficos para otros segmentos de la población que tienen compromiso inmunitario o están en alto riesgo de infección. Existen pocos estudios en los cuales los animales o humanos se han alimentado con HMO. Asimismo, pocos estudios han evaluado los efectos, que tiene sobre la respuesta inmunitaria, alimentar con mezclas complejas de HMO. De ahí que se necesite investigación futura para delinear los mecanismos y conocer por completo

el potencial de los HMOI para el beneficio de la función inmunitaria del lactante.

## Declaración

Sharon Donovan ha recibido financiamiento con becas provenientes de Nestlé Nutrition R&D. Sarah Comstock no tiene nada que declarar.

## Referencias

- Levy O, Wynn JL: A prime time for trained immunity: innate immune memory in newborns and infants. *Neonatology* 2014;105:136–141.
- Walker WA, Iyengar RS: Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Res* 2015;77:220–228.
- Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K: Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* 2015; 91:629–635.
- Turfkruyer M, Verhassel V: Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Curr Opin Infect Dis* 2015;28: 199–206.
- Donovan SM: Role of human milk components in gastrointestinal development: current knowledge and future needs. *J Pediatr* 2006; 149:S49–S61.
- American Academy of Pediatrics, Section on Breastfeeding: Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012;129:e827–e841.
- Horta BL, Victora CG: Long-term Effects of Breastfeeding. Geneva, World Health Organization, 2013. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79198/1/9789241505307\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79198/1/9789241505307_eng.pdf) (accessed September 15, 2016).
- Li M, Wang M, Donovan SM: Early development of the gut microbiome and immunemediated childhood disorders. *Semin Reprod Med* 2014;32:74–86.
- Wang M, Monaco MH, Donovan SM: Impact of early gut microbiota on immune and metabolic development and function. *Semin Fetal Neonat Med* 2016, Epub ahead of print.
- Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL: Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annu Rev Nutr* 2014;34:143–169.
- Kunz C, Meyer C, Collado MC, Geiger L, Garcia-Mantrana I, Bertua-Rios B, Martinez-Costa C, Borsch C, Rudloff S: Influence of gestational age, secretor and Lewis blood group status on the oligosaccharide content of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016, Epub ahead of print.
- Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Muller-Werner B, Jelinek J, Stahl B: Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr* 2010;104:1261–1271.
- Martin-Sosa S, Martin MJ, Garcia-Pardo LA, Hueso P: Sialyloligosaccharides in human and bovine milk and in infant formulas: variations with the progression of lactation. *J Dairy Sci* 2003;86:52–59.
- Newburg DS, He Y: Neonatal gut microbiota and human milk glycans cooperate to attenuate infection and inflammation. *Clin Obstet Gynecol* 2015;58:814–826.
- Kulinich A, Liu L: Human milk oligosaccharides: the role in the fine-tuning of innate immune responses. *Carbohydr Res* 2016;432:62–70.
- Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, Popovic M, Parker E, Lemay DG, Van Tassell ML, Miller MJ, Jin YS, German JB, Lebrilla CB, Mills DA: Maternal bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 2015;3:13.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinen-Derr J, Guerrero MDL, et al: Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* 2004;14:253–263.
- Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA: *Bifidobacterium longum* subspecies infantis: champion colonizer of the infant gut. *Pediatr Res* 2015;77:229–235.
- Garrido D, Barile D, Mills DA: A molecular basis for bifidobacterial enrichment in the infant gastrointestinal tract. *Adv Nutr* 2012;3:415S–421S.
- Steenhout P, Sperisen P, Martin F-P, Sprenger N, Wernimont S, Pecquet S, Berger B: Term infant formula supplemented with human milk oligosaccharides (2'-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose) shifts stool microbiota and metabolic signatures closer to that of breastfed infants. *FASEB J* 2016;30 (suppl 1):275.7
- Li M, Bauer LL, Chen X, Wang M, Kuhlenschmidt TB, Kuhlenschmidt MS, Fahey GC Jr, Donovan SM: Microbial composition and in vitro fermentation patterns of human milk oligosaccharides and prebiotics differ between formula-fed and sow-reared piglets. *J Nutr* 2012;142:681–689.
- Li M, Monaco MH, Wang M, Comstock SS, Kuhlenschmidt TB, Fahey GC Jr, Miller MJ, Kuhlenschmidt MS, Donovan SM: Human milk oligosaccharides shorten rotavirus-induced diarrhea and modulate piglet mucosal immunity and colonic microbiota. *ISME J* 2014;8:1609–1620.
- Goto Y, Kiyono H: Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev* 2012;245:147–163.
- Sassone-Corsi M, Raffatellu M: No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol* 2015;194:4081–4087.
- Hester SN, Donovan SM: Individual and combined effects of nucleotides and human milk oligosaccharides on proliferation, apoptosis and necrosis in a human fetal intestinal cell line. *Food Nutr Sci* 2012;3:1567–1576.
- Holscher HD, Davis SR, Tappenden KA: Human milk oligosaccharides influence maturation of human intestinal Caco-2Bbe and HT-29 cell lines. *J Nutr* 2014;144:586–591.
- Bhatia S, Prabhu PN, Benefiel AC, Miller MJ, Chow J, Davis SR, Gaskins HR: Galacto-oligosaccharides may directly enhance intestinal barrier function through the modulation of goblet cells. *Mol Nutr Food Sci* 2015;59:566–573.
- Lane JA, O'Callaghan J, Carrington SD, Hickey RM: Transcriptional response of HT-29 intestinal epithelial cells to human and bovine milk oligosaccharides. *Br J Nutr* 2013;110:2127–2137.
- He Y, Liu S, Kling DE, Leone S, Lawlor NT, Huang Y, Feinberg SB, Hill DR, Newburg DS: The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. *Gut* 2016;65:33–46.
- Mezoff EA, Hawkins JA, Ollberding NJ, Karns R, Morrow AL, Helmrath MA: The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose augments the adaptive response to extensive intestinal resection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016;310:G427–G438.
- Wickramasinghe S, Pacheco AR, Lemay DG, Mills DA: Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiol* 2015;15:172.

32. Marcobal A, Sonnenburg JL: Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(suppl 4):12–15.
33. Kavanaugh D, O'Callaghan J, Kilcoyne M, Kane M, Joshi L, Hickey RM: The intestinal glycome and its modulation by diet and nutrition. *Nutr Rev* 2015;73:359–375.
34. Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, Looijer-van Langen M, Madsen KL: Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:1025–1034.
35. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD: Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology* 2005;115:153–162.
36. Comstock SS, Wang M, Hester SN, Li M, Donovan SM: Select human milk oligosaccharides directly modulate peripheral blood mononuclear cells isolated from 10-d-old pigs. *Br J Nutr* 2014;111:819–828.
37. Goehring KC, Kennedy AD, Prieto PA, Buck RH: Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PLoS One* 2014;9:e101692.
38. Marriage BJ, Buck RH, Goehring KC, Oliver JS, Williams JA: Infants fed a lower calorie formula with 2'-fucosyllactose (2'FL) show growth and 2'FL uptake like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;61:649–658.
39. Ruhaak LR, Stroble C, Underwood MA, Lebrilla CB: Detection of milk oligosaccharides in plasma of infants. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:5775–5784.
40. Bode L, Kunz C, Muhly-Reinholz M, Mayer K, Seeger W, Rudloff S: Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost* 2004;92:1402–1410.
41. Bode L, Rudloff S, Kunz C, Strobel S, Klein N: Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil beta 2 integrin expression. *J Leukoc Biol* 2004;76:820–826.
42. Rabinovich GA, Croci DO: Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* 2012;36:322–335.
43. Schnaar RL: Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: a concise introduction to glycobiology for the allergist. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:609–615.
44. Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y: Self- and nonselfrecognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:33–54.
45. Koning N, Kessen SF, Van Der Voorn JP, Appelmelk BJ, Jeurink PV, Knippels LM, Garssen J, Van Kooyk Y: Human milk blocks DCSIGN-pathogen interaction via MUC1. *Front Immunol* 2015;6:112.
46. Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC: Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* 2014;14:653–666.
47. Stephenson HN, Mills DC, Jones H, Milioris E, Copland A, Dorrell N, Wren BW, Crocker PR, Escors D, Bajaj-Elliott M: Pseudaminic acid on *Campylobacter jejuni* flagella modulates dendritic cell IL-10 expression via Siglec-10 receptor: a novel flagellin-host interaction. *J Infect Dis* 2014;210:1487–1498.
48. Earl LA, Bi S, Baum LG: N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem* 2010;285:2232–2244.
49. Hester SN, Chen X, Li M, Monaco MH, Comstock SS, Kuhlenschmidt TB, Kuhlenschmidt MS, Donovan SM: Human milk oligosaccharides inhibit rotavirus infectivity in vitro and in acutely infected piglets. *Br J Nutr* 2013;110:1233–1242.
50. Luhn K, Wild MK: Human deficiencies of fucosylation and sialylation affecting selectin ligands. *Semin Immunopathol* 2012;34:383–399.
51. Castillo-Courtade L, Han S, Lee S, Mian FM, Buck R, Forsythe P: Attenuation of food allergy symptoms following treatment with human milk oligosaccharides in a mouse model. *Allergy* 2015;70:1091–1102.
52. Kurakevich E, Hennet T, Hausmann M, Rogler G, Borsig L: Milk oligosaccharide sialyl( $\alpha$ 2,3) lactose activates intestinal CD11c+ cells through TLR4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:17444–17449.
53. Goehring KC, Marriage BJ, Oliver JS, Wilder JA, Barrett EG, Buck RH: Similar to those who are breastfed, infants fed a formula containing 2'-fucosyllactose have lower inflammatory cytokines in a randomized controlled trial. *J Nutr* 2016, DOI: 10.3945/jn.116.236919.
54. Puccio G, Alliet P, Cajozzo C, Janssens E, Corsello G, Wernimont S, Egli D, Gosoni L, Sprenger N, Steenhout P: Effects of infant formula with human milk oligosaccharides on growth and morbidity: a randomized multicenter trial. *JPGN*, in press.
55. Hanlon PR, Thorsrud BA: A 3-week preclinical study of 2'-fucosyllactose in farm piglets. *Food Chem Toxicol* 2014;74:343–348.
56. Kashyap PC, Marcobal A, Ursell LK, Smits SA, Sonnenburg ED, Costello EK, Higginbottom SK, Domino SE, Holmes SP, Relman DA, Knight R, Gordon JI, Sonnenburg JI: Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:17059–17064.
57. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA Jr: Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol* 2001;167:442–450.
58. Seppo AE, Autran CA, Bode L, Jarvinen KM: Human milk oligosaccharides and development of cow's milk allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2016, Epub ahead of print.
59. Huang YL, Chassard C, Hausmann M, von Itzstein M, Hennet T: Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. *Nat Commun* 2015;6:8141.
60. Severi E, Hood DW, Thomas GH: Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* 2007;153:2817–2822.
61. Audry M, Jeanneau C, Imberty A, Harduin-Lepers A, Delannoy P, Breton C: Current trends in the structure-activity relationships of sialyltransferases. *Glycobiology* 2011;21:716–726.
62. Kuijff ML, Samsom JN, van Rijs W, Bax M, Huizinga R, Heikema AP, van Doorn PA, van Belkum A, van Kooyk Y, Burgers PC, Luidert TM, Endtz HP, Nieuwenhuis EE, Jacobs BC: TLR4-mediated sensing of *Campylobacter jejuni* by dendritic cells is determined by sialylation. *J Immunol* 2010;185:748–755.