



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

**METABOLOMICA DEL LATTE MATERNO: L'IMPORTANZA
DEL FENOTIPO SECRETORE**

Relatore:

Prof. Vassilios Fanos

Tesi laurea di:

Giulia Pruneddu

Anno Accademico: 2016/2017

Indice

Introduzione	2
1. Il neonato e il latte materno	3
1.1 Cenni storici	3
1.2 Classificazioni neonatali	4
1.3 Produzione del latte materno	7
1.4 Differenze tra latte materno, latte vaccino e latte formulato	10
2. Nuove ricerche sul latte materno	20
2.1 Il microbiota	20
2.2 Cellule staminali	27
2.3 Metabolomica	31
3. Metabolomica del latte materno: l'importanza del fenotipo secretore	37
3.1 Obiettivi dello studio	37
3.2 Pazienti e metodi	37
3.3 Risultati	38
3.4 Discussione	42
3.5 Conclusioni	45
➤ BIBLIOGRAFIA	47

Introduzione

Il latte materno è un fluido complesso che si è evolutivamente adattato per soddisfare le richieste nutrizionali del neonato. Oltre i classici nutrienti come proteine, carboidrati, lipidi, vitamine e minerali, il latte contiene numerose componenti bioattive (1). Tra queste si annoverano fattori di crescita, componenti antimicrobiche e le cellule staminali, che hanno la capacità di integrarsi in vivo nei tessuti del neonato e di differenziarsi in cellule mature (2).

Il latte materno ha la caratteristica di variare notevolmente da donna a donna, e cambia costantemente durante la lattazione per adattarsi al maggiore fabbisogno del neonato che cresce. Tra le componenti variabili del latte si includono gli oligosaccaridi che rappresentano la terza componente più abbondante. Essi hanno importanti funzioni, come la modulazione della composizione del microbiota intestinale che influenza un gran numero di processi fisiologici del neonato (3).

L'applicazione della metabolomica in neonatologia offre un approccio per investigare la complessa relazione tra la nutrizione e la salute del bambino. La caratterizzazione del metaboloma del latte materno confrontato a quello del latte in formula permette di capire quanto ogni singolo nutriente influenzi il metabolismo del neonato e offre la possibilità di intervenire sulla composizione della dieta a seconda delle richieste nutrizionali del neonato (4).

In questo studio si è voluto caratterizzare il metaboloma dei campioni di latte raccolti da una popolazione di madri che hanno avuto figli appropriati per età gestazionale, grossi per età gestazionale e con ritardo di crescita intrauterino.

Le analisi dei dati, effettuate con differenti metodi chemiometrici, hanno fornito informazioni sulla variabilità metabolica dei campioni. Sono stati identificati due gruppi differenziabili in rapporto alla presenza di differenti tipi di oligosaccaridi del latte e sono stati classificati in due fenotipi: secretore e non secretore.

Il neonato e il latte materno

1.1 Cenni storici

Per neonato, (dal greco νέος "nuovo" e dal lat. natus "nato"), si intende un bambino dalla nascita al 28° giorno di vita, in quanto presenta peculiarità che lo distinguono dalla successiva età del lattante (5).

Proprio per queste sue peculiarità, negli anni '60 nacque la branca della neonatologia e un numero crescente di pediatri si dedicò a tempo pieno ad essa (6).

Il termine neonatologia fu introdotto nel 1960 ed è stato attribuito ad Alexander Schaffer, che usò questo termine nell'introduzione del suo primo libro (7).

Prima del XIX secolo non esistevano istituzioni per l'assistenza dei neonati, ad eccezione degli orfanotrofi, dove però il tasso di mortalità raggiungeva il 95%. L'industrializzazione durante il XIX secolo comportò l'assunzione delle donne nelle fabbriche, con conseguente aumento dell'allattamento artificiale e del numero di neonati abbandonati, che portò al più alto record di mortalità infantile (più di 230 per mille nati). Questo altissimo tasso di mortalità, accompagnato dal decremento delle nascite, provocò la paura del calo demografico e della debolezza dell'esercito per la difesa nazionale, per questo si istituì in Europa "il movimento per il benessere del neonato" dal 1870 al 1920. Questo movimento dimostrò per la prima volta come la medicina neonatale fosse influenzata da interessi politici e sociali. Furono costruite le incubatrici, si ampliarono i reparti e si stabilirono le basi per la medicina neonatale (8).

Inoltre, John Ballantyne, un noto ostetrico scozzese, mise in luce l'importanza del monitoraggio della salute della gestante, e fece notare come patologie quali la sifilide, il tifo, la tubercolosi e l'assunzione di sostanze tossiche si ripercuotessero sulla salute e sulla crescita del feto (9).

Nel XX secolo, dopo la fine della seconda guerra mondiale, ci fu un'esplosione della medicina neonatale, con progressi nella raccolta del sangue, fluidoterapia, e antibioticoterapia. Il 90% dei parti si verificava negli ospedali e questo comportò la costruzione di un gran numero di reparti di neonatologia (10).

Nel 1952, l'anestesista Virginia Apgar ideò l'assegnazione di un punteggio per il neonato, che fosse un metodo rapido della valutazione clinica al 1' ed al 5' minuto dalla nascita. L'Apgar score che viene utilizzato tutt'oggi si basa sulla valutazione di 5 parametri: frequenza cardiaca,

respirazione, tono muscolare, riflessi e colore della cute, ognuno dei quali dà un punteggio di 0, 1 o 2 (11).

A metà degli anni '60, vennero utilizzati i primi ventilatori meccanici per i neonati affetti da sindrome da distress respiratorio, nel 1965 fu aperta la prima unità di terapia intensiva neonatale (TIN) nel Connecticut ed infine, negli ultimi 20 anni, grazie alla fototerapia, all'introduzione dell'imaging neonatale è migliorata l'assistenza clinica al neonato con conseguente incremento dell'aspettativa di vita, ponendo le basi per la moderna neonatologia (12).

1.2 Classificazioni neonatali

Un neonato è definito come un bambino sotto i 28 giorni di età. Nel corso di questi primi 28 giorni di vita, il bambino è ad alto rischio di morte. Per questo motivo è fondamentale che, durante questo periodo, siano previste un'alimentazione e delle cure adeguate, al fine di migliorare le possibilità di sopravvivenza del bambino e porre le basi per una vita sana (13).

Subito dopo la nascita è necessario eseguire un attento esame obiettivo. Il neonato a termine ha un colorito rosa, piange vigorosamente, muove equamente tutte le estremità, e flette gli arti in modo simmetrico. I valori normali dei dati obiettivi sono riportati in Tabella 1.

Segni vitali	Valori normali
Frequenza cardiaca	Da 120 a 140 bpm
Frequenza respiratoria	Da 40 a 60 atti al minuto
Pressione arteriosa	Da 60 a 90 mmHg
Temperatura	Da 36.5 a 37.5°C
Peso	Femmine: da 2.8 a 4.0 kg Maschi: da 2.9 a 4.2 kg
Lunghezza	Da 48 a 53 cm
Circonferenza cranica	Da 33 a 37 cm

Tabella 1. Segni obiettivi nella norma dei neonati (Modificata da Lewis et al. 2014).

Per la classificazione del neonato si usano due parametri principali: l'età gestazionale e il peso (15).

In base all'età gestazionale si classifica il neonato in: pretermine, a termine e post termine. L'età gestazionale viene calcolata dal primo giorno dell'ultima mestruazione della madre, oppure dalla lunghezza vertice-sacro, che è un indice ecografico molto accurato (16).

Per neonato pretermine si intende quello che nasce prima della 37esima settimana di gestazione. L'80% dei bambini pretermine nasce tra la 32esima e la 37esima settimana, circa il 10% nasce tra la 28esima e la 32esima settimana, e circa il 5% nasce prima delle 28 settimane di gestazione (17).

Il neonato a termine è definito come un bambino nato tra la 37esima e la 42esima settimana, mentre per neonato post termine si intende dopo la 42esima settimana (294 giorni) (18).

In base al peso si possono classificare i neonati in nati con:

- peso normale alla nascita >2.500 kg,
- peso basso alla nascita <2.500 kg;
- peso molto basso <1.500 kg;
- peso estremamente basso <1.000 kg (19).

Il peso alla nascita gioca un importante ruolo nella morbilità e mortalità neonatale, nello sviluppo e nella salute del bambino. Un basso peso alla nascita è un rischio importante per molte patologie dell'infanzia. I fattori di rischio sono vari, includendo la giovane età della madre, la primiparità e il basso stato sociale. Riveste un ruolo importante anche lo stato di nutrizione della madre prima e durante la gravidanza. Il BMI prima della gravidanza e l'aumento di peso durante la gravidanza hanno mostrato associazioni valide con il peso alla nascita (20).

Rapportando il peso all'età gestazionale il neonato viene classificato in:

- neonato appropriato per età gestazionale (AGA): ha un peso alla nascita tra il 10° ed il 90° percentile in base alla popolazione di riferimento (21);
- neonato piccolo per età gestazionale (SGA): ha un peso inferiore al 10° percentile. Si differenziano SGA moderati, tra il 3° e il 10° percentile e SGA severi è al di sotto del 3° percentile (22);
- neonato grosso per età gestazionale (LGA) ha un peso al di sopra del 90° percentile (23).

Per determinare se il neonato è piccolo, appropriato o grosso per età gestazionale, è necessario conoscere l'età gestazionale, il peso alla nascita, il sesso e la razza (Figura 1).

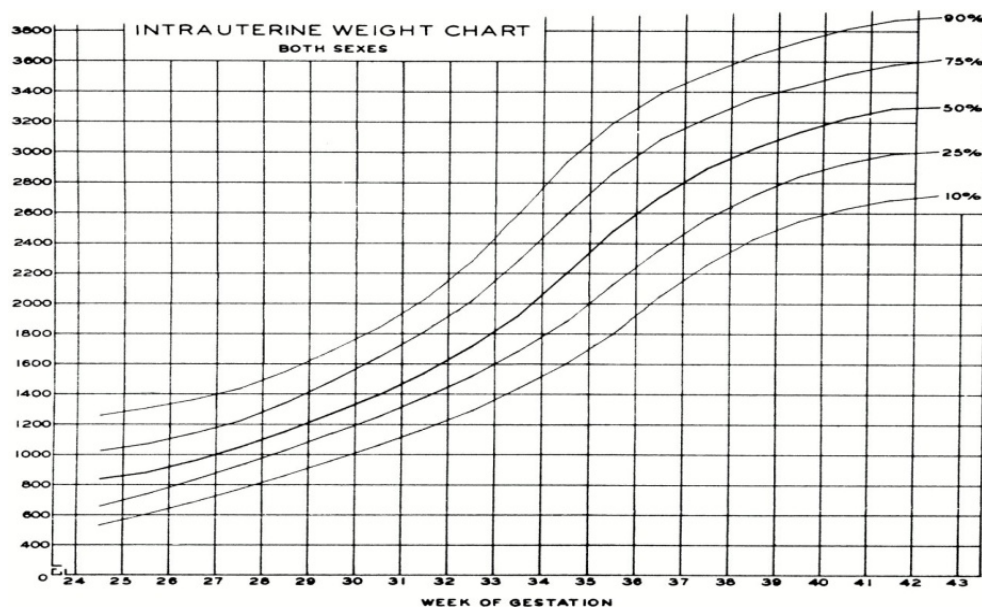


Figura 1 (modificata da Lubchenco et al, 1963).

Un'altra classificazione individua i neonati con il termine Intrauterine Growth Restriction (IUGR), che si riferisce ad un feto che non riesce a raggiungere il potenziale peso stimato per una specifica età gestazionale, comunemente uguale o superiore al 10° percentile (24) (25). La riduzione della crescita fetale viene diagnosticata tramite almeno due ecografie fetali che consentono di rilevare l'epoca di comparsa e l'entità del ritardo o dell'arresto di crescita intrauterino (26).

Le cause del ritardo di crescita intrauterino possono essere:

- materne: l'età, farmaci assunti, il fumo di sigaretta e le infezioni;
- fetali: malformazioni, infezioni, errori del metabolismo e anomalie cromosomiche;
- placentari: come insufficienze placentari o infezioni;
- genetiche: possono riguardare geni materni, fetali o placentari (27).

I neonati IUGR hanno un aumentato rischio di sviluppare una sindrome metabolica nell'età adulta, obesità, alterata tolleranza ai carboidrati, diabete mellito di tipo 2, ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, patologie cardiovascolari. Questo è il risultato dei cambiamenti dell'asse endocrino-metabolico che il feto deve adottare per adattarsi ad un alterato ambiente intrauterino e per assicurarsi la sopravvivenza.

Un alterato ambiente intrauterino, come una restrizione nutrizionale, causa una

“riprogrammazione” dell’asse endocrino-metabolico del feto, che ha benefici nella sopravvivenza a breve termine. Questa riprogrammazione è dovuta ad un’iperattivazione dell’asse ipotalamo-ipofisi-surrene che porta ad un incremento dei livelli di cortisolo. È stato dimostrato che, nell’infanzia, i neonati IUGR hanno alti livelli di cortisolo nelle urine e, nell’adolescenza, un incremento del picco di cortisolo al mattino. Questo porta ad un danno endoteliale, che è responsabile del successivo sviluppo delle patologie cardiovascolari e dell’insulino-resistenza (28).

Invece, il neonato piccolo per età gestazionale (SGA) può essere costituzionalmente piccolo per fattori materni come: altezza, peso, età ed etnia. Essi possono avere complicanze a lungo termine come una riduzione della sensibilità insulinica precoce. Il meccanismo fisiopatologico della resistenza insulinica è probabilmente secondario alla prolungata riduzione del nutrimento fetale e durante questo periodo il metabolismo fetale riaggiusta la lenta crescita con una resistenza insulinica (29).

Quindi, nonostante l’eziopatogenesi sia differente, le conseguenze a lungo termine del neonato IUGR e del neonato SGA risultano essere le stesse.

1.3 Produzione del latte materno

La capacità di secernere latte si sviluppa durante la gravidanza, quando la ghiandola mammaria viene trasformata in un organo esocrino altamente specializzato con ampie strutture lobulo-alveolari. La trasformazione della ghiandola è regolata da vari ormoni e comprende cambiamenti cellulari e strutturali, fondamentali per l’acquisizione della funzione secretoria e per il corretto trasporto dei soluti.

Durante la gravidanza si assiste ad una notevole proliferazione delle cellule epiteliali duttali e alveolari (30).

Studi condotti sui topi hanno mostrato che la proliferazione delle cellule duttali, che si organizzano in strutture complesse con diramazioni laterali, ha un picco nei primi 5 giorni di gravidanza, e la proliferazione delle cellule alveolari resta elevata dal 6° al 15° giorno di gravidanza. Durante questo periodo c’è un marcato incremento del numero delle strutture tubulo-alveolari e la perdita dei cuscinetti adiposi, che implica una progressiva riorganizzazione della ghiandola mammaria da un organo prevalentemente adiposo ad uno con funzione secretoria.

Esperimenti con geni knockout hanno dimostrato che la formazione delle strutture tubulo-alveolari dipende dall'azione dei recettori del progesterone e della prolattina, che attivano i *pathways* della STAT5, ciclina D1 e Wnt (31).

La lattogenesi, ossia la differenziazione della ghiandola mammaria in organo secretorio, inizia circa a metà della gravidanza nella maggior parte delle specie e viene divisa in una fase di iniziazione e una di attivazione. In queste due fasi si osserva una diversa composizione del secreto della ghiandola e una diversa espressione genica, nonché differenti proprietà strutturali e funzionali delle cellule alveolari. La fase di iniziazione, precedentemente chiamata Lattogenesi I, inizia alla 24esima settimana ed è caratterizzata dall'espressione di geni che codificano per le proteine del latte e enzimi biosintetici, con accumulo di gocce lipidiche. Le cellule alveolari diventano capaci di secernere alcune componenti del latte con conseguente innalzamento dei valori di alfa-lattalbumina e lattosio nelle urine e nel plasma (32). Il massimo livello di espressione dei geni delle proteine del latte è raggiunto solo con la lattogenesi II.

La fase di differenziazione (Lattogenesi II) è caratterizzata da un'abbondante secrezione di latte e inizia dopo il parto. Questa fase è caratterizzata dall'aumentata espressione di geni che codificano per proteine del latte da parte delle cellule alveolari, dalla polarizzazione degli organelli, espansione dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico rugoso, maturazione dell'apparato del Golgi e chiusura delle "tight junction". Questi cambiamenti riflettono le modificazioni della composizione e del volume del latte rispetto alla fase di iniziazione, con maturazione dei meccanismi secretori e di trasporto.

La caduta dei livelli di progesterone dopo il parto è richiesta per l'inizio della secrezione del latte e per la trascrizione delle proteine del latte. La rimozione della placenta, la fonte del progesterone, è necessaria per la secrezione del latte. È stato infatti dimostrato che la ritenzione di frammenti placentari che continuano a secernere progesterone ritarda la lattazione. Inoltre, prolattina e cortisolo devono essere presenti in concentrazioni appropriate per attivare la secrezione del latte.

Sono due gli ormoni che regolano la produzione del latte: la prolattina e l'ossitocina.

La prolattina è essenziale per la fase proliferativa dell'alveologenesi e della lattogenesi. È un ormone polipeptidico sintetizzato e secreto da cellule specializzate dell'ipofisi anteriore chiamate lattotrope, ma anche da altri organi e tessuti come la ghiandola mammaria. La sua secrezione è influenzata da fattori inibitori e stimolatori. Il principale fattore inibitore è la dopamina, quelli

stimolatori includono l'ormone tireotropo, ossitocina e neurotensina (33).

La prolattina (PRL) agisce su uno specifico recettore che appartiene alla superfamiglia dei recettori delle citochine. Il legame della prolattina al suo recettore induce una dimerizzazione del recettore e attivazione delle vie JAK/Stat e PKB7Akt che portano alla trascrizione delle proteine del latte e all'inibizione dell'involutione della ghiandola (34).

I livelli plasmatici di PRL aumentano significativamente durante la gravidanza, probabilmente stimolati dagli alti livelli di estrogeni, e questi livelli si mantengono elevati durante l'allattamento. Le donne con deficit di solfatasi placentare, che provoca bassi livelli di estrogeni durante la gravidanza, hanno anche bassi livelli di prolattina e di conseguenza non possono allattare. Anche quando l'ipofisi è inibita da agenti come la bromocriptina, agonista della dopamina, la lattogenesi è inibita fino alla sospensione della bromocriptina. Durante l'allattamento la secrezione di prolattina viene stimolata tramite la suzione (35).

La secrezione del latte è possibile grazie alla contrazione delle cellule mioepiteliali, che formano una struttura a canestro attorno agli alveoli, dove è conservato il latte. La stimolazione delle terminazioni nervose nel capezzolo produce impulsi afferenti ai neuroni ipotalamici, i cui assoni raggiungono l'ipofisi posteriore e stimolano il rilascio di ossitocina. In questo modo l'ossitocina viene trasportata tramite il flusso sanguigno alla ghiandola mammaria, si lega agli specifici recettori nelle cellule mioepiteliali e causa la contrazione delle cellule mioepiteliali, che sono situate attorno agli alveoli e ai dotti. Quando gli alveoli si contraggono, la compressione delle cellule aumenta la pressione intra alveolare, con espulsione del latte dagli alveoli al sistema duttale. Inoltre, la contrazione delle cellule mioepiteliali lungo i dotti, ne favorisce la compressione, riducendo la resistenza al flusso del latte nel sistema duttale.

Questo processo viene chiamato riflesso di eiezione del latte e può essere condizionato, oltre che dalla suzione, anche da stimoli esterni come sentire il vagito del bambino (36).

La produzione del latte è regolata localmente da una sostanza chiamata fattore inibente la lattazione, un polipeptide prodotto dalle cellule alveolari. Esso agisce con meccanismo autocrino bloccando reversibilmente la produzione del latte quando il latte non viene rimosso dalla ghiandola. Quindi, un drenaggio efficace dal seno è fondamentale per aumentare la produzione di latte (37).

Di recente, è stato dimostrato che la ghiandola mammaria produce GH, leptina e peptide correlato al paratormone. Questi vengono secreti nel latte e nel plasma con conseguenti effetti metabolici.

In particolare il peptide correlato al paratormone ha un importante ruolo nella mobilitazione del calcio dalle ossa, infatti i livelli sierici del calcio plasmatico e della fosfatasi alcalina sono alti nelle donne che allattano (38).

Non appena viene stabilito l'allattamento, la quota di latte secreto è regolata soprattutto dalle richieste del neonato, tramite i meccanismi di feedback correlati alla quantità di latte che rimane negli alveoli al termine della suzione. L'allattamento viene mantenuto da una regolare suzione da parte del neonato, senza questo stimolo la secrezione del latte si ferma e si stabilisce un'involuzione della ghiandola. L'involuzione è caratterizzata da una sdifferenziazione e apoptosi delle cellule epiteliali, entrambe regolate dai cambiamenti ormonali e da meccanismi intra-mammari.

Studi effettuati in vitro dimostrano che l'involuzione è correlata alla riduzione dei livelli di prolattina, GH e IGF-1. Normalmente il GH stimola la sintesi dell'IGF-1 e la prolattina ottimizza l'azione dell'IGF-1 sopprimendo l'IGFBP-5, la proteina legante l'IGF (39).

L'involuzione dell'epitelio della ghiandola mammaria può avvenire in tre circostanze:

- insufficiente rimozione del latte dalla ghiandola mammaria;
- riduzione del supporto ormonale, soprattutto della prolattina;
- diminuzione della produzione del latte.

La fagocitosi degli alveoli degenerati riduce le strutture lobulo-alveolari e il sistema duttale torna ad essere predominante (40).

Grazie a nuove tecniche di biologia molecolare sono stati fatti notevoli passi avanti nel capire i meccanismi di secrezione del latte e i processi che regolano il trasporto dei soluti. Pertanto è stato possibile definire nel dettaglio il funzionamento e la regolazione della lattazione.

1.4 Differenze tra latte materno, latte vaccino e latte formulato

Latte materno

Il latte materno contiene una combinazione unica di componenti, differendo dal latte degli altri mammiferi sia per la concentrazione che per la composizione.

Subito dopo il parto viene secreto dalla ghiandola mammaria il colostro, che differisce dal latte maturo per le sue caratteristiche fisiche e per la concentrazione dei nutrienti. Ha un intenso colore giallastro, indicativo delle sue alte concentrazioni di carotenoidi, incluse α -carotene, β -carotene,

β -critoxantina, luteina e zeaxantina. Il carotene contenuto nel colostro è circa 10 volte superiore di quello del latte maturo (41). In circa 4 giorni il contenuto del latte si modifica rapidamente, aumentano le concentrazioni di acidi grassi e lattosio, mentre il contenuto di proteine e minerali si riduce.

Esistono delle differenze tra il latte delle madri che partoriscono pretermine e quelle che partoriscono a termine. Durante i primi 3-4 giorni di lattazione, il latte pretermine ha un contenuto maggiore di proteine, una maggiore concentrazione di sodio e più basse di lattosio rispetto al latte delle donne che partoriscono a termine (Figura 2). Le concentrazioni di calcio, magnesio e fosforo sono simili nel latte pretermine e a termine, così come quelle del rame, ferro, e zinco. Le componenti bioattive e immunologiche sono differenti nel latte umano pretermine e post termine (42).

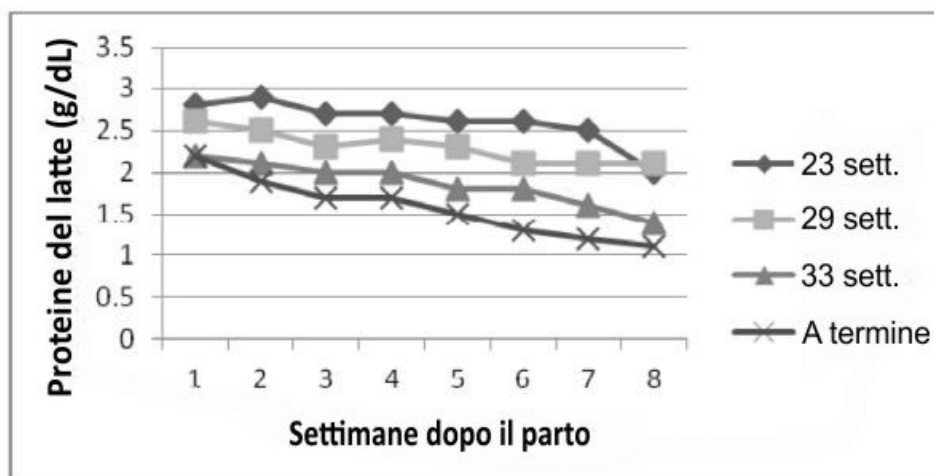


Figura 2. Differenza tra le proteine del latte in relazione alla settimana di gestazione (modificata da Ballard, 2013).

Il latte maturo contiene l'87% di acqua, 3-5% di grassi, 0.9% di proteine, 6.9-7.2% di carboidrati e lo 0.2% di minerali. L'energia contenuta è 60-75 kcal/100 ml. La concentrazione dei nutrienti è mostrata nella Tabella 2 (1).

Nutrienti	Concentrazione nel latte materno	Nutrienti	Concentrazione nel latte materno
	g/L \pm SD		μ g/L \pm SD
Lattosio	72.0 \pm 2.5	Vitamina A	670 \pm 200
Proteine	10.5 \pm 2.0	Vitamina D	0.55 \pm 0.10
Grassi	39.0 \pm 4.0	Vitamina K	2.1 \pm 0.1
	mg/L \pm SD	Folate	85 \pm 37
Calcio	280 \pm 26	Vitamina B12	0.97
Fosforo	140 \pm 22	Biotina	4 \pm 1
Magnesio	35 \pm 2	Iodio	110 \pm 40
Sodio	180 \pm 40	Selenio	20 \pm 5
Potassio	525 \pm 35	Manganese	6 \pm 2
Cloro	420 \pm 60	Fluoro	16 \pm 5
Ferro	0.3 \pm 0.1	Cromo	50 \pm 5
Zinco	1.2 \pm 0.2		
Rame	0.25 \pm 0.03		
Vitamina E	2.3 \pm 1.0		
Vitamina C	40 \pm 10		
Tiamina	0.210 \pm 0.035		
Riboflavina	0.350 \pm 0.025		
Niacina	1.500 \pm 0.200		
VitaminaB6	93 \pm 8		
Acido Pantotenico	1.800 \pm 0.200		

Tabella 2. Concentrazione dei nutrienti nel latte materno (modificata da Institute of Medicine (US) Committee on Nutritional Status During Pregnancy and Lactation, 1991)

Lipidi

I lipidi sono la fonte principale di energia nel latte materno. Il 98% dei lipidi secreti sono trigliceridi, la restante parte è costituita da diacilglicerolo, monogliceridi, acidi grassi liberi, fosfolipidi e colesterolo. Queste componenti formano delle gocce lipidiche, con il core formato da trigliceridi e la membrana da fosfolipidi.

Il latte contiene circa 200 tipi di acidi grassi, in particolare l'acido oleico in quantità di 30-40 g/100 g (45). Gli acidi grassi polinsaturi a catena lunga con più di 20 atomi di carbonio costituiscono il 2% di tutti gli acidi grassi presenti nel latte materno (46).

Gli acidi grassi derivano dal plasma e sono mobilitati dai depositi di grasso o dall'intestino, oppure possono essere sintetizzati direttamente a partire dal glucosio dalle cellule alveolari. Gli acidi grassi sintetizzati dalla ghiandola mammaria hanno una catena con al massimo 16 atomi di Carbonio, quelli che derivano dalla dieta e dal tessuto adiposo hanno una catena carboniosa più lunga.

Gli acidi grassi a catena corta oltre ad essere una fonte indispensabile di energia (47), sono essenziali per la maturazione del tratto gastrointestinale (48). Inoltre la sfingomielina, presente nella membrana della goccia lipidica, è importante per la mielinizzazione del sistema nervoso centrale, ed è stato dimostrato che incrementa lo sviluppo neurologico dei bambini nati con basso peso (49). È stato inoltre dimostrato che i lipidi del latte materno inattivano in vitro un gran numero di agenti patogeni, come lo Streptococco di gruppo B (50).

Proteine

Il latte umano contiene più di 400 diversi tipi di proteine che hanno differenti funzioni: nutrimento, antimicrobiche e immunomodulatorie. L'80-90% delle proteine sono prodotte dai lattociti, la restante parte arriva nel latte per transitosi dal circolo materno.

Possono essere divise in tre gruppi: caseine, del siero e mucine. Le caseine sono presenti in micelle sospese in soluzione, le proteine del siero sono solubili e le mucine sono presenti nelle membrane delle gocce lipidiche.

Le caseine sono di tre tipi: α -, β - e κ -caseina. La κ -caseina stabilizza le α e β caseine che sono insolubili, formando una sospensione colloidale (51).

Il latte contiene una significativa concentrazione di α -amilasi, che aiuta il neonato nella digestione dei carboidrati complessi (52); α 1-antitripsina, che limita l'attività degli enzimi pancreatici (53); β -caseina che si complessa con il calcio e lo rende maggiormente solubile (54) e lattoferrina, una proteina legante il ferro che facilita l'uptake nelle cellule intestinali (55). Quest'ultima ha anche importanti proprietà antimicrobiche, studi recenti hanno dimostrato che inibisce l'adesione dell'E. Coli enteropatogeno alle cellule intestinali, con un processo mediato dall'attività della serin-proteasi della lattoferrina (56). Un'altra importante proteina antimicrobica è il lisozima, capace di degradare la membrana esterna dei batteri Gram positivi, idrolizzando i residui terminali (57).

Inoltre anche le immunoglobuline sono presenti nel latte, in particolare le IgA (>90%), seguite dalle IgG. La concentrazione di IgA presenti nel colostro è circa 12 mg/ml, il latte maturo ne contiene 1 mg/ml. Esse vengono trasferite nel latte tramite un meccanismo recettore-mediato da parte delle cellule epiteliali. Dopo la suzione, entrano nel tratto gastroenterico del neonato, conferendogli un'immunità passiva (58). Svolgono una funzione protettiva nelle superfici delle mucose, poiché le secrezioni neonatali contengono piccole tracce di IgA e IgM. Infatti, nei neonati allattati al seno, già nel secondo giorno di vita si possono riscontrare IgA nelle feci, mentre nei neonati che assumono latte in formula, le feci contengono IgA dopo un mese dalla nascita (59).

Carboidrati

Una grande quantità di carboidrati è presente nel latte, in particolare il più rappresentato risulta essere il lattosio, formato dal legame tra glucosio e galattosio. Anche gli oligosaccaridi costituiscono un'importante frazione di carboidrati nel latte, sono circa 12.9 g/L nel latte maturo (60). Essi occupano il terzo posto per abbondanza tra le componenti del latte. Sono stati identificati più di 200 differenti tipi, tutti presentano il lattosio nell'estremità terminale della molecola e in vitro sono resistenti al catabolismo da parte delle idrolasi (61). Chaturvedi et al. hanno calcolato che il 97% degli oligosaccaridi risultano indigeriti nel neonato, mentre Coppa et al. stimano una percentuale del 40-50% (62).

I monosaccaridi che costituiscono gli oligosaccaridi sono: L-fucosio, D-glucosio, D-galattosio, N-acetilglucosamina e acido N-acetilneuraminico. Gli oligosaccaridi funzionano da prebiotici,

promuovendo la crescita di certe specie benefiche di batteri, come il *Bifidobacterium infantis*, che previene la colonizzazione di batteri patogeni. Gli oligosaccaridi prevengono anche la diarrea neonatale e infezioni del tratto respiratorio (63).

La produzione degli oligosaccaridi è geneticamente determinata, e i differenti tipi di oligosaccaridi dipendono da specifiche transferasi espressi nei lattociti. Due geni, importanti per la determinazione del profilo di oligosaccaridi che la madre produce, sono i geni dei gruppi sanguigni Lewis (Le) e il gene Secretorio (Se). Il gene Secretore codifica per l'enzima α [1,2]-fucosiltransferasi (FUT2), responsabile dell'aggiunta di fucosio con un legame α 1-2 alla catena oligosaccaridica. Invece, il gene del gruppo sanguigno di Lewis codifica per l'enzima FUT3, che aggiunge il fucosio con legame α 1-3,4 alla catena.

Gli individui che hanno un locus Se attivo vengono classificati come Secretori (64) e producono concentrazioni abbondanti di 2-fucosillattosio (2'FL), lactodifucotetraosio (LDFT), lacto-N-fucopentaosio I (LNFP I) e altri oligosaccaridi α 1-2 fucosilati.

Invece, gli individui non-Secretori hanno una carenza dell'enzima FUT2, perciò il loro latte non contiene HMO α 1-2 fucosilati.

Le donne che esprimono il gene di Lewis (Le), definite come Le positive, presentano oligosaccaridi fucosilati in posizione α 1-4. Al contrario, le donne Le negative, non esprimono questi oligosaccaridi α 1-4 fucosilati e LNFP II (65).

Risulta quindi possibile l'espressione di questi due enzimi e quattro fenotipi di oligosaccaridi: Se+/Le+, Se-/Le+, Se+/Le-, Se-/Le- (66). I differenti tipi di oligosaccaridi proteggono i neonati dalle infezioni a seconda dei diversi residui presenti. I neonati che sono allattati dal fenotipo Se+ sono protetti dalla diarrea causata da *Campilobacter*, *Calicivirus* e tossine di *E. Coli* Enterotossigeno. Gli oligosaccaridi α 1,2-fucosilati impediscono l'adesione dei patogeni, competendo con i recettori delle cellule epiteliali. Il latte delle donne con il fenotipo non secretore (Se-) contiene più basse quantità di oligosaccaridi fucosilati rispetto al fenotipo Se+, ma gli oligosaccaridi non fucosilati sono in quantità maggiori. Nonostante il latte contenga meno oligosaccaridi fucosilati, offre una protezione al neonato agendo come prebiotico per specifici tipi di Bifidobatteri dell'intestino e previene il legame alle cellule intestinali e la citotossicità da parassiti protozoari (67).

Vitamine

Il contenuto di vitamine nel latte è influenzato dalla dieta materna, perciò un ridotto apporto di vitamine nella dieta si ripercuote sul contenuto di vitamine nel latte. A prescindere dalla dieta, la concentrazione di vitamina K è estremamente bassa nel latte e per questo l'Associazione Americana Pediatrica ne raccomanda la somministrazione alla nascita per prevenire la malattia emorragica del neonato. Anche la vitamina D è presente in basse concentrazioni nel latte, soprattutto nelle madri che vivono ad alte latitudini o che si espongono raramente alla luce solare. Per questo è necessaria una supplementazione nel neonato (43).

La concentrazione della vitamina A diminuisce nei primi giorni dell'allattamento da valori di 600 µg/L a 200 µg/L. Le fonti di vitamina A per la sintesi del latte sono la proteina legante il retinolo del plasma e gli esteri del retinolo nei chilomicroni.

Circa l'83% del contenuto totale di vitamina E è l' α -tocoferolo, invece, β -, γ -, δ -tocoferoli sono presenti in piccole quantità. La concentrazione di tocoferoli, che sono in quantità maggiori nel colostro (8mg/L), si riduce e si stabilizza nel latte maturo (3-4 mg/L).

La concentrazione di vitamina C nel latte di una donna ben nutrita è approssimativamente 100 mg/L e si riduce nel latte maturo (68).

La vitamina B6 è in quantità ridotte nel colostro e aumenta nel latte maturo (circa 0.2 mg/L). È un importante cofattore in molte reazioni metaboliche (69). La forma predominante di vitamina B-6 nel latte materno è il piridossale (75%), con piccole quantità di piridossalfofosfato (9%), piridossamina e piridossina.

La vitamina B12 viene secreta nel latte legata alle proteine del siero e la sua concentrazione è di circa 0.5-1.0 µg/L. Il neonato è particolarmente vulnerabile nel caso di deficit di vitamina B12. Sono stati riportati casi di deficit di vitamina B12 in neonati allattati da madri strettamente vegetariane o affette da anemia perniziosa, con conseguenti disabilità neurologiche (70).

Latte vaccino

La composizione del latte vaccino, la base di molte sostituzioni per l'allattamento durante i secoli, differisce considerevolmente rispetto al latte materno. Contiene circa 32g/L di proteine ed è una fonte importante di aminoacidi essenziali. Nonostante il contenuto di proteine del siero sia simile a quello del latte materno, il latte vaccino ha una quantità di caseine 7 volte maggiore. Il

rapporto proteine del siero e caseine nel latte materno è circa 35:65, nel latte vaccino è 19:81. Tale concentrazione di caseine è molto difficile da digerire per il neonato. Inoltre gli aminoacidi taurina e cisteina sono presenti in concentrazioni molto più basse nel latte vaccino e sono indispensabili per la crescita del neonato prematuro (71).

Il contenuto di lipidi è di circa 37g/L, il 95% dei quali è rappresentato dal triacilglicerolo, composto prevalentemente da acidi grassi saturi a catena corta e una percentuale ridotta di acidi grassi polinsaturi. Il 2% è costituito da diacilglicerolo, 0.5% da colesterolo e 1% da fosfolipidi (72).

Il latte vaccino ha un basso contenuto di zinco, niacina, vitamina C, e vitamina E, e un più alto quantitativo di sodio, potassio, calcio e fosforo. Gli alti fosfati sono implicati nell'insorgenza della tetania ipocalcémica del neonato. Invece, l'elevato apporto di proteine, sodio, potassio, cloro e fosforo sono associati ad una riduzione della funzionalità renale, e dall'aumento dell'osmolalità sierica di circa 2 volte rispetto ai neonati che assumono latte materno. I neonati che assumono latte vaccino sono quindi più a rischio di disidratazione.

L'uso del latte vaccino può indurre microemorragie intestinali, probabilmente causate dall'albumina bovina, una proteina termolabile (73).

La principale immunoglobulina del latte vaccino è una IgG, e lattoferrina e lisozima sono presenti in piccole quantità. In più, molti fattori non-nutrizionali presenti nel latte materno sono assenti nel latte vaccino, o sono presenti solo in tracce. Per il neonato, queste differenze si ripercuotono sulla digeribilità e sull'assorbimento dei nutrienti e sono assenti i benefici tratti dai fattori non-nutrizionali.

Per tutte queste ragioni è meglio introdurre il latte vaccino nella dieta dopo l'anno di vita (71).

Latte formulato

La maggior parte del latte in formula per neonati contiene: una fonte di proteine, di solito del latte vaccino oppure proteine di soia o diverse proteine idrolizzate; lattosio; una combinazione di oli vegetali; sali minerali e vitamine. L'esatta concentrazione di queste componenti è strettamente regolata da specifiche linee guida, con dei valori massimi e minimi (tabella 3) (74).

Componente	Unità di misura	Massimo	Minimo
Energia	Kcal/100 ml	60	70
Proteine del latte vaccino	g/100 kcal	1,8	3
Proteine di soia	g/100 kcal	2,25	3
Lipidi totali	g/100 kcal	4,4	6
Acido linoleico	g/100 kcal	0,3	1,2
Carboidrati totali	g/100 kcal	9	14
Vitamina A	µg/100 kcal	60	180
Vitamina D	µg/100 kcal	1	2,5
Vitamina K	µg/100 kcal	4	25
Vitamina C	µg/100 kcal	10	30
Ferro	mg/100 kcal	0,3	1,3
Calcio	Mg/100 kcal	50	140

Tabella 3. Valori raccomandati per il latte in formula (modificata da Koletzko et al. 2005).

Una bassa percentuale di latte in formula è preparata con proteine di soia e carboidrati a base di mais, ed è quindi priva di proteine del latte vaccino e lattosio. Il suo uso deve essere limitato ai neonati affetti da Galattosemia e deficit congenito della lattasi, in quanto la soia contiene fitoestrogeni, che provocano effetti dannosi sullo sviluppo sessuale, neurocomportamentale e immunitario (76).

Il latte vaccino rappresenta la base per la maggior parte del latte in formula. È reso più simile al latte materno con delle particolari modifiche:

- si rimuovono i grassi saturi e si sostituiscono con oli vegetali;
- si riduce il contenuto di proteine per non sottoporre il rene ad un carico troppo elevato;
- si aggiungono sali minerali e vitamine, in particolare correggendo il rapporto calcio/fosforo e aggiungendo il ferro, per prevenire l'anemia da carenza marziale.

La riduzione della concentrazione proteica riguarda le caseine, abbondanti nel latte vaccino e

difficilmente digeribili dal neonato. Per questo si è modificato il rapporto proteine del siero:caseine, rendendo la formula più simile a quella del latte materno (77). Tuttavia, il contenuto di aminoacidi ramificati (valina, leucina, isoleucina) resta più elevato nel latte in formula, causando più alte concentrazioni di insulina nel neonato (78).

Inoltre, è stato visto che riducendo la concentrazione delle proteine nel latte in formula, si abbassano le concentrazioni di triptofano che è un aminoacido essenziale. Perciò viene aggiunto triptofano libero alla formula, oppure si incrementa la quantità di alfa-lattalbumina che ha una quantità elevata di triptofano. Studi clinici hanno mostrato che in questo modo le concentrazioni plasmatiche di triptofano dei neonati sono molto simili (79).

Per quanto riguarda le funzioni bioattive, alcune proteine del latte vaccino sono simili a quelle del latte umano. In primo luogo l' α -lattalbumina, che oltre ad avere un quantitativo elevato di triptofano, rilascia alcuni peptidi che hanno bioattività e il tripeptide immunostimolatorio GLF (glicil-leucil-fenilalanina), che stimola l'attività fagocitica dei macrofagi peritoneali in vitro nei topi e ha un effetto protettivo contro le infezioni da *K. Pneumoniae*. Altri peptidi si comportano da prebiotici stimolando la crescita dei Bifidobatteri, e inibendo la crescita dei patogeni (80).

Infine, sono state aggiunte nel latte in formula le proteine delle membrane delle gocce lipidiche del latte come mucine, lactaderina, sfingomielina, gangliosidi, acido sialico, colesterolo, che svolgono sia una funzione antimicrobica, con riduzione della diarrea del neonato, che un importante ruolo nello sviluppo cognitivo (81).

Nonostante gli sforzi per rendere sempre più simile il latte in formula al latte materno, ci sono dei limiti soprattutto per quanto riguarda le componenti bioattive. I neonati allattati al seno e quelli allattati con formula hanno un differente stato nutrizionale e differenze nel microbiota intestinale. Questo può essere associato ad un maggior rischio di obesità, diabete di tipo 1 e 2, e patologie cardiovascolari.

Per questo l'organizzazione mondiale della sanità raccomanda l'allattamento esclusivo al seno per i primi sei mesi di vita.

Nuove ricerche sul latte materno

2.1 Il microbiota

Il microbiota, dal greco μικρός piccolo e βίος vita, è un complesso e dinamico ecosistema formato da centinaia di differenti microrganismi, soprattutto batteri. Il numero totale dei batteri è 10 volte superiore a quello delle cellule dell'organismo umano (82).

Il microbiota può essere considerato come un organo acquisito dopo la nascita ed è composto da differenti microrganismi che attuano numerose funzioni per l'ospite. Il microbiota intestinale è notevolmente esposto ad influenze ambientali e perciò la sua composizione e la sua funzione sono modulate da fattori esterni come l'alimentazione. Specifiche sue componenti, come i Lattobacilli e Bifidobatteri, hanno importanti effetti benefici per l'ospite, come la promozione della maturazione e dell'integrità dell'intestino, la difesa contro gli agenti patogeni ed un effetto immunomodulante. Oltre a ciò, il microbiota promuove il mantenimento dell'omeostasi immunitaria e ha un'azione anti-infiammatoria (83). Altre funzioni del microbiota intestinale sono mostrate in tabella 4.

Funzioni protettive	Funzioni strutturali	Funzioni metaboliche
Rimozione degli agenti patogeni	Fortificazione della barriera intestinale	Controllo della differenziazione e proliferazione delle cellule epiteliali intestinali
Competizione dei nutrienti	Induzione della produzione di IgA	Metabolismo dei carcinogeni della dieta
Antagonismo recettoriale	Rafforzamento apicale delle tight junction	Sintesi di vitamine
Produzione di fattori antimicrobici	Sviluppo del sistema immunitario	Assorbimento ioni e recupero energetico

Tabella 4. Funzioni della flora intestinale (modificata da O'Hara et al. 2006).

Il primo e il più importante contributo alla genesi del microbiota è la trasmissione verticale del microbiota materno (85). Fino a pochi anni fa si pensava che l'ambiente uterino fosse sterile e che il feto non entrasse in contatto con i batteri fino al momento della nascita, tuttavia studi recenti suggeriscono la presenza di un microbiota all'interno della placenta, che fanno pensare che la colonizzazione batterica inizi prima del parto.

Aagard et al. hanno recentemente caratterizzato un profilo del microbiota placentare, composto da batteri commensali non patogeni come Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, and Fusobacteria, simile al microbiota del cavo orale dell'uomo. Inoltre hanno osservato che nella prima settimana di vita del neonato a termine il microbiota intestinale è colonizzato prevalentemente da batteri della famiglia di Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes e in minor misura da Firmicutes (Tabella 5). Questo mette in evidenza che potrebbe esserci, nella placenta, un'esposizione prenatale ad alcune specie di batteri commensali (86). Ad avvalorare questa teoria, recenti studi hanno dimostrato che neanche il meconio è sterile. I batteri isolati dal meconio sono spesso simili a quelli della flora orale e intestinale della madre, in particolare *E. Fecalis*, *S. Epidermidis* ed *E. Coli* sono le specie predominanti. Questi batteri diffondono dal tratto digerente ad altri ambienti trasportati dalle cellule dendritiche, che giungono nell'epitelio intestinale, si associano ai microrganismi e li trasportano tramite il circolo ematico in altri distretti. In questo modo i batteri possono colonizzare a distanza altre superfici mucose, in particolare il tratto genito-urinario e durante la gravidanza anche la ghiandola mammaria. Questo processo spiega l'abbondanza di cellule batteriche anche nel latte materno (87) (88).

PHYLUM	GENUS
Actinobacteria	Bifidobacterium Propionibacterium Corynebacterium Streptomices
Proteobacteria	Enterobacter Escherichia Klebsiella Acinetobacter
Firmicutes	Lactobacillus Staphylococcus Streptococcus Enterococcus Clostridium
Bacteroidetes	Bacteroides Prevotella

Tabella 5. Classificazione dei comuni batteri trovati nel microbiota intestinale del neonato (Modificata da Gritz et al, 2015).

Alla nascita l'intestino del neonato è colonizzato da batteri simbiotici con un processo che può essere diviso in 4 parti:

- Acquisizione alla nascita della flora vaginale, intestinale e cutanea della madre;
- Introduzione del latte materno o in formula;
- Introduzione dell'alimentazione complementare;
- Acquisizione completa della flora intestinale, simile a quella dell'adulto.

Inizialmente l'intestino del neonato è caratterizzato da una mucosa fortemente immunoresponsiva e di conseguenza è più suscettibile alle perturbazioni che originano dal lume intestinale. Gli enterociti immaturi sono più sensibili a stimoli infiammatori, come il lipopolisaccaride e la flagellina, esprimono alti livelli della proteina inibitoria che lega il fattore di trascrizione NFκB

(Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) e rilasciano Interleuchina 8, causando un'inflammatione persistente che può compromettere l'integrità della mucosa intestinale. Per questo motivo è importante lo stabilirsi di un microbiota che promuova la salute dell'intestino sin dai momenti più precoci (89).

Vari fattori influenzano l'iniziale colonizzazione del neonato ed includono: la modalità del parto, l'età gestazionale al momento della nascita, esposizione precoce agli antibiotici e la nutrizione.

La modalità del parto ha un'importante influenza sulla diversità e funzione del microbiota.

In caso di parto naturale, il neonato entra in contatto con i batteri del canale del parto e la colonizzazione del tratto GI viene influenzata dalla composizione della flora del tratto genitale della madre, dalle condizioni sanitarie e dalle tecniche ostetriche. I primi colonizzatori sono batteri anaerobi facoltativi come Enterobacteriaceae, Enterococcus, Streptococcus e una piccola percentuale di anaerobi stretti come Bifidobacteria, Bacteroides e Clostridi (90).

I neonati nati da parto cesareo sono colonizzati da specie presenti nella cute della madre e nell'ambiente ospedaliero, come Clostridi, Stafilococchi, Propionobacterium e Corynebacterium, hanno un deficit di anaerobi ed un basso numero di Bacteroides e Bifidobacteria rispetto ai neonati nati da parto spontaneo (91). Il parto cesareo può essere associato ad una maggiore suscettibilità per le infezioni nel bambino. Secondo uno studio del 2011, i bambini nati da parto cesareo hanno un più alto rischio di contrarre un'infezione da S. Aureus meticillino resistente. Questo può essere dovuto alla mancata esposizione alla flora vaginale materna, che conferisce una protezione contro gli agenti patogeni (92).

Oltre alla modalità del parto, il fattore che influenza maggiormente la composizione del microbiota neonatale è la nutrizione.

Il latte materno, oltre a fornire al neonato un adeguato apporto calorico, stimola le difese intestinali tramite diversi meccanismi. Contiene numerose componenti bioattive, come la lattoferrina, che inibisce la crescita di batteri patogeni e virus (93) e le immunoglobuline, che aiutano a prevenire l'attacco di batteri enteropatogeni e stimolano la crescita di Bifidobatteri, che rappresentano il 70% circa del totale microbiota intestinale (94). Inoltre, nel latte materno sono stati trovati batteri non patogeni, che influenzano la composizione dinamica del microbiota intestinale del neonato.

I primi studi sulla presenza di batteri nel latte hanno mostrato la predominanza di Stafilococchi, Streptococchi, Propionibacteria e altri batteri Gram positivi, tra cui lo Streptococcus Lactarius.

Infatti durante il terzo trimestre di gravidanza si sviluppa un microbiota mammario, che raggiunge la più elevata complessità alla fine di questo periodo, rimane costante durante la lattazione e si riduce fino a scomparire con la fine dell'allattamento per i processi apoptotici di involuzione della ghiandola.

Vari studi hanno dimostrato che è presente un trasferimento dalla madre al figlio di batteri che appartengono al genere di Lactobacilli, Stafilococchi, Enterococchi e Bifidobatteri tramite l'allattamento (95).

L'origine dei batteri presenti nel latte è diventato controverso negli ultimi anni. Prima si pensava che fossero il risultato della contaminazione batterica della cute della madre o del cavo orale del neonato, in quanto è possibile un reflusso di latte nei dotti mammari durante la suzione (96). Alcuni batteri presenti nella cute dell'adulto come Stafilococchi, Corynebacteria e Propionibacteria sono comuni nel latte materno (97), e questo suggerisce che l'interazione con il microbiota della cute possa contribuire al modellamento della composizione del microbiota del latte. Tuttavia esistono delle notevoli differenze tra i due microbioti, per questo il microbiota del latte non può essere soltanto il risultato di una contaminazione della cute. Infatti, i Lattobacilli ed Enterococchi isolati nel latte umano sono genotipicamente differenti da quelli isolati nella cute, inoltre i Bifidobatteri appartengono al genere degli anaerobi stretti e per questo non è possibile che provengano dalla cute. Perciò è stata suggerita una via entero-mammaria, che porti i batteri dal tratto intestinale alla ghiandola mammaria. È stato dimostrato che le cellule dendritiche giungono nell'epitelio intestinale, aprono le *tight junction* tra le cellule epiteliali preservando l'integrità della barriera, si legano ai batteri non patogeni (98) e li trasportano nei linfonodi mesenterici, dove rimangono per alcuni giorni. Tramite il sistema linfatico i batteri intestinali possono diffondersi in altri distretti, tra cui la ghiandola mammaria.

Nello studio si è visto che, inoculando particolari batteri tra cui *Enterococcus Faecium* nel cavo orale di topi gravide, si possono isolare questi batteri nel liquido amniotico e nel latte. Inoltre è stato evidenziato un aumento del trasferimento di batteri dall'intestino ai linfonodi mesenterici e alla ghiandola mammaria nei topi gravidi e durante l'allattamento (99). Le placche del Peyer dei topi gravidi risultano essere più grandi rispetto ai controlli ed hanno anche vasi linfatici più dilatati. Lo stesso studio ha mostrato che il latte contiene batteri come *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* in associazione a cellule mononucleate materne. Questo suggerisce il coinvolgimento di cellule mononucleate nel trasporto di batteri intestinali alla

ghiandola mammaria.

La presenza di batteri nel latte è importante per la riduzione dell'incidenza e severità delle infezioni nel neonato allattato, con differenti meccanismi come la produzione di sostanze antimicrobiche, il potenziamento della barriera intestinale tramite la produzione di mucine e la riduzione della permeabilità intestinale.

Inoltre il latte ha una funzione metabolica, infatti il glicobioma di alcuni Lattobacilli e Bifidobatteri, includendo alcune specie isolate dal latte, possono aiutare nel creare uno specifico microbiota dell'intestino del neonato. Questi microrganismi possono aiutare la digestione del neonato tramite la rottura dei legami degli zuccheri e proteine. Inoltre incrementano la produzione di metaboliti come il butirrato, che è la principale fonte di energia per le cellule del colon e un importante componente nella modulazione della funzione intestinale (100).

Oltre a ciò, il latte materno ha una capacità tamponante, che permette di acidificare il contenuto intestinale per essere più facilmente fermentato dai batteri del colon prossimale; ha un effetto inibitorio sulla crescita dei Clostridi, Bacteroides ed altri anaerobi (101). Alcuni costituenti del latte, come l'interleuchina 10, fattori di crescita, eritropoietina rappresentano un'importante mediazione nella risposta infiammatoria contro i batteri patogeni.

A differenza del microbiota dei neonati nutriti con latte materno, quello dei neonati nutriti con latte in formula è costituito prevalentemente da Escherichia coli, Clostridium difficile, Bacteroides, Prevotella, e Lactobacillus e una percentuale ridotta di Bifidobacteria (102). I neonati allattati con latte in formula vengono esposti a differenti tipi di carboidrati, batteri e nutrienti che portano ad una differente colonizzazione del microbiota. In particolar modo gli oligosaccaridi presenti nel latte in formula sono strutturalmente differenti da quelli presenti nel latte materno e difficilmente possono mimare gli effetti mostrati nei neonati allattati al seno.

Una volta stabilitosi, il microbiota vive in simbiosi con l'ospite. Il sistema immunitario del neonato matura rapidamente con l'influenza del microbiota, della dieta, esposizione a nuovi microbi, xenobiotici e altri fattori ambientali.

L'introduzione dell'alimentazione complementare ha un profondo impatto sulla composizione del microbiota, portando all'incremento di Bacteroides e ad un decremento delle popolazioni di Bifidobacteria, Enterobacteria, e alcune specie di Clostridium (103). Nei bambini più grandi e negli adulti, una dieta con un eccesso di proteine e grassi animali è associata ad un microbiota

con prevalenza di Bacteroides, invece un eccesso di carboidrati nella dieta provoca una maggiore prevalenza di Prevotella (104).

Negli ultimi decenni sono stati fatti numerosi studi per definire gli effetti a breve e a lungo termine correlati all'iniziale colonizzazione del microbiota intestinale.

La composizione del microbiota acquisita nella prima infanzia è critica per lo sviluppo della risposta immunitaria, influenza lo sviluppo delle risposte Thelper-1 e Thelper-2 mediate e tramite la regolazione delle vie patogenetiche aiuta a prevenire patologie associate ad una risposta immunitaria eccessiva.

Il tipo di nutrimento nei primi mesi di vita sembra essere il più importante determinante della salute dell'individuo e la sua azione protettiva si esplica con la modulazione del microbiota intestinale. Recentemente, con l'aggiunta di fattori prebiotici nel latte in formula si è potuto modificare il microbiota dei neonati e stimolare la risposta immunitaria (105). Nonostante ciò, il latte materno ha delle proprietà uniche per cui deve essere considerato come prima scelta di nutrimento nei primi sei mesi di vita. Tali proprietà includono la presenza di componenti bioattive, capaci di stimolare il sistema immunitario del neonato; fattori anti-microbici per la prevenzione di infezioni. Inoltre, la presenza di acidi grassi a catena lunga nel latte materno favorisce il neurosviluppo, con un incremento delle capacità cognitive, motorie e visive del bambino (106). In uno studio del 1994, i neonati pretermine allattati con latte materno hanno dimostrato di avere uno sviluppo mentale e psicomotorio più veloce rispetto ai neonati allattati con formula (107).

Infine, esiste un'evidenza epidemiologica che i bambini allattati al seno siano protetti da allergie e atopie (108), obesità (109) e leucemie e linfomi nell'infanzia (110).

2.2 Cellule staminali

Le cellule staminali sono le cellule progenitrici di tutti i tessuti dell'organismo umano e sono caratterizzate da due proprietà: la capacità di autorinnovarsi e la capacità di generare linee cellulari differenziate.

La capacità di autorinnovarsi si realizza con due meccanismi:

- divisione simmetrica, che serve ad incrementare il pool di cellule staminali e non genera una progenie differenziata;
- divisione asimmetrica, che mantiene il pool di cellule staminali e contemporaneamente genera una progenie differenziata (111).

Si possono distinguere cellule staminali embrionali (ESC) e cellule staminali adulte, caratterizzate da proprietà differenti. Le ESC derivano dalla blastocisti, sono pluripotenti e possono potenzialmente dare origine a tutti i tessuti dell'organismo (112).

Le cellule pluripotenti possono generare cellule multipotenti, che hanno una capacità differenziativa ridotta e che a loro volta danno origine alle cellule differenziate dei tre foglietti embrionali: endoderma, ectoderma e mesoderma.

Le cellule staminali adulte hanno un potenziale differenziativo limitato, possono essere riscontrate in diversi tessuti dell'organismo come il cervello, il midollo osseo, il fegato e altri. Tutti questi tessuti sono in uno stato perpetuo di rinnovamento, anche in assenza di un insulto, in quanto le cellule staminali danno continuamente origine a nuove cellule per rimpiazzare quelle più vecchie (113) (114).

Nell'adulto, le cellule staminali sono localizzate in nicchie staminali, un microambiente che mantiene l'omeostasi tissutale, formato da cellule endoteliali, mesenchimali e altre cellule. Le cellule presenti nella nicchia garantiscono un riparo alle cellule staminali, in quanto le sequestrano da stimoli differenziativi, apoptotici, e provvedono al mantenimento di una riserva di cellule staminali (115).

Recentemente è stato dimostrato che le cellule adulte hanno una capacità di transdifferenziazione, ovvero possono essere riprogrammate in cellule simili a quelle embrionali, perciò hanno un importante ruolo nella medicina rigenerativa (116).

La presenza di cellule staminali nella ghiandola mammaria è stato oggetto di vari studi a partire dagli anni '70 (117) in quanto essa, durante la lattogenesi, viene rimodellata e trasformata in una ghiandola secernente il latte, proprio grazie alla presenza di cellule staminali mammarie (MaSC). Le MaSC sono bipotenti e hanno la capacità di differenziarsi in due principali linee cellulari: mioepiteliali e luminali.

Esistono due tipi di cellule epiteliali luminali: quelle che si differenziano in lattociti, e quelle che formano il lume dei dotti.

I lattociti possono essere identificati tramite l'espressione di proteine del latte (β -caseina, α -lattalbumina, lattoferrina), citocheratina 18 (CK18) e la presenza dei globuli di grasso.

Le cellule duttali non producono proteine del latte e esprimono la citocheratina 19 (CK19).

Le cellule mioepiteliali esprimono citocheratina 14 (CK14) e l'actina del muscolo liscio (SMA) (118).

Le cellule staminali mammarie sono quiescenti e vengono attivate durante la gravidanza e la lattogenesi, sotto il controllo degli ormoni della lattogenesi (2) (119).

Nel 2007 Cregan et al. hanno evidenziato per la prima volta che il latte materno contiene cellule staminali mesenchimali (MSC). Queste cellule sono state identificate grazie all'espressione di particolari markers come citocheratine (CK5, CK14 e CK19) e nestina (120).

Esse esprimono altri marcatori di superficie come CD44, CD29, Sca-1, e sono negative per CD33, CD34, CD45, CD73, confermando la loro identità di cellule mesenchimali staminali. Presentano la vimentina, l'actina del muscolo liscio e l'E-caderina, un marker di transizione epiteliale-mesenchimale. Anche la potenziale differenziazione multipotente è stata provata: queste cellule si possono differenziare in linee adipogeniche, condrogeniche e osteogeniche sotto il controllo di specifici sistemi in vitro. Questo significa che le MSC, isolate dal latte materno, possono potenzialmente essere riprogrammate in differenti tipi di tessuti umani (121).

Successivamente l'espressione dei marker CD49 e p63 è stata dimostrata da Thomas et al (122), e in uno studio successivo Hassiotou et al. è stata evidenziata l'espressione di markers pluripotenti in una subpopolazione di cellule staminali. Queste cellule esprimono OCT4, SOX2, la proteina homeobox NANOG, e KLF4 che controllano la pluripotenzialità delle cellule embrionali staminali (123).

Nello studio di Hosseini et al, si è visto che, nel latte materno esiste una subpopolazione di cellule che esprime sia antigeni di superficie pluripotenti come l'OCT4, Nanog, SOX2, sia marker di cellule staminali mesenchimali come la nestina. Esse sono state fatte crescere in coltura con particolari fattori di crescita, e si è visto che possono differenziarsi in tre linee cellulari, che comprendono cellule neuronali, oligodendrociti e astrociti. Perciò le cellule staminali del latte materno possono comportarsi come le cellule staminali neuronali, formando un'aggregazione di cellule chiamata neurosfera per poi differenziarsi in cellule del sistema nervoso (124).

Nonostante l'espressione di markers pluripotenti, esistono importanti differenze tra le cellule staminali del latte materno e le cellule embrionali pluripotenti. A dimostrazione di ciò, è stato fatto un esperimento sui topi immunodeficienti, nei quali sono state iniettate cellule pluripotenti del latte materno e cellule pluripotenti OCT4 positive. È stato visto che dopo nove settimane dall'iniezione, i topi iniettati con cellule staminali del latte materno non presentavano la neoformazione di tumori, come teratomi. Invece, nei topi del gruppo di controllo in cui erano state iniettate cellule OCT4 positive, si è vista la formazione di tumori scarsamente differenziati. Questo suggerisce una fondamentale differenza tra le cellule pluripotenti embrionali e quelle adulte (125).

Uno dei marker per identificare le cellule staminali mesenchimali è il CD44. Nell'esperimento sono state identificate singole cellule CD44 positive, o in alcuni casi, cellule raggruppate che possono essere CD44 positive o negative. In un altro esperimento, usando differenti campioni di latte materno, si è visto che la percentuale di cellule CD44-positive varia a seconda dell'età gestazionale e della lattazione. Il loro numero infatti decresce durante la lattazione. Inoltre si è cercato di capire se il meccanismo di morte programmata di queste cellule sia comparabile a quello delle cellule somatiche. Tramite il marcatore Ki67, si è visto che una piccola percentuale di cellule era positiva e alcune di queste presentavano una frammentazione del nucleo, che è un tipico evento apoptotico. Queste cellule possono essere cellule staminali che, dopo la proliferazione, sono bloccate in una fase del ciclo cellulare e vengono poi eliminate con l'apoptosi (126).

Date le recenti scoperte si è ancora lontani dallo stabilire quali siano le funzioni delle cellule staminali presenti nel latte. Sono stati effettuati alcuni studi sui topi femmine geneticamente

modificati, le cui cellule contengono un gene chiamato TdTomato (pomodoro), che le rende rosse sotto la luce fluorescente. È stato visto che quando questi topi allattano, le cellule staminali presenti nel latte materno oltrepassano la parete dello stomaco della prole e arrivano nel circolo ematico. Quando questi topi diventano adulti, si ritrovano le cellule pomodoro nel loro sangue e in altri tessuti e organi, tra i quali lo stomaco, il timo, il fegato, il pancreas, la milza e il cervello. Questo studio fornisce per la prima volta l'evidenza che le cellule staminali giungono negli organi del neonato, dove si integrano e si differenziano in cellule mature. Tale procedimento serve a contribuire alla protezione e allo sviluppo immunitario del neonato (127)(128).

Questo fenomeno viene chiamato microchimerismo, per cui le cellule materne, con il loro materiale genetico e altri costituenti, sono presenti nella prole e possono rimanere per lungo tempo. Il microchimerismo materno inizia nell'utero quando lo scambio di cellule staminali è favorito dalla placenta, e questo scambio continua dopo la nascita durante l'allattamento (129).

La medicina rigenerativa potrebbe avere dei benefici dall'utilizzo di queste cellule, soprattutto nel campo delle patologie neurodegenerative. Lo scopo della medicina rigenerativa è ottenere un numero sufficiente di uno specifico tipo di cellule staminali per ripristinare la normale fisiologia di una parte del corpo danneggiata da un insulto fisico, chimico o ischemico o da una patologia infettiva o genetica (130).

Inoltre la capacità delle cellule staminali di integrarsi in vivo e di differenziarsi in cellule pancreatiche secernenti insulina, epatociti funzionali, sono una promessa per il trattamento del diabete o di patologie epatiche. In questo modo anche di cellule staminali del latte materno potrebbero essere utilizzate come le cellule staminali del cordone ombelicale.

Perciò il latte materno non dovrebbe più essere considerato soltanto come una fonte di nutrienti, ma come uno strumento utilizzato dalla madre per trasferire le cellule staminali al neonato, sia per garantirgli una crescita ottimale sia per rafforzare il suo sistema immunitario. Questa nuova visione della relazione post natale tra madre e figlio può essere alla base di una nuova entità nel campo della programmazione fetale, che può anche essere definito come la medicina rigenerativa fisiologica materna (131).

2.3 Metabolomica

La metabolomica è un approccio basato sullo studio sistematico del set di metaboliti in un sistema biologico (132).

È la più giovane e promettente tra le scienze “omiche” e rappresenta un approccio olistico volto ad individuare i metaboliti che costituiscono una cellula, un tessuto o un organismo. Ha la capacità di fornire un’impronta digitale del fenotipo di una cellula o di un tessuto grazie alla misurazione dei metaboliti direttamente da un sistema biologico complesso. Le analisi metabolomiche possono rilevare qualsiasi molecola di peso inferiore ad 1 kDa, che includono aminoacidi, oligopeptidi, zuccheri, steroidi, acidi grassi implicati in diversi “pathways” biochimici (133) (134).

L’approccio della metabolomica consta di due fasi:

- la fase analitica, che serve ad identificare lo spettro di metaboliti di basso peso molecolare in un sistema biologico. Gli strumenti più utilizzati per lo studio dei profili sono la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, la spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia in fase gassosa o liquida.
- La fase di analisi e di interpretazione dei dati, che richiede dei software complessi e un ampio database di metaboliti per la corretta descrizione dei pathway metabolici (135).

La metabolomica è capace di fornire uno scatto del metaboloma, l’intero set di metaboliti prodotto da un organismo, uno specchio che riflette lo stato fisiologico, evolutivo e patologico di un sistema biologico (136).

L’applicazione della metabolomica in neonatologia offre un approccio per investigare la complessa relazione tra la nutrizione e la salute del bambino. La caratterizzazione del metaboloma del latte materno confrontato a quello del latte in formula permette di capire quanto ogni singolo nutriente influenzi il metabolismo del neonato, e offre la possibilità di intervenire nella composizione della dieta a seconda delle richieste nutrizionali del neonato (4).

Autore e anno	Popolazione	Obiettivi	Principali metaboliti	Risultati sui metaboliti
Marincola et al. 2012	<ul style="list-style-type: none"> - Madri che hanno partorito pretermine - Madri che hanno partorito a termine - Latte in formula usato per i nati pretermine 	Confronto tra i profili metabolici del HBM pretermine e latte in formula.	Lattosio, maltosio, acido oleico e linoleico	Il latte materno contiene più alte concentrazioni di lattosio e di acidi grassi rispetto al latte in formula, il quale invece è più ricco di maltosio.
Smilowitz et al. 2013	- Madri che hanno partorito a termine	Influenza del fenotipo materno e dieta nel metabolismo del HBM.	2'-FL, LDFT, LNFP I, fucosio, 3'FL, LNFP II	2'-FL, LDFT, LNFP I riflettono lo stato secretorio della madre, il 3'FL e LNFP II sono caratteristici del fenotipo non secretorio
Praticò et al. 2014	- Madri che hanno partorito a termine	Influenza del fenotipo materno nella composizione di HMO.	2'-FL, LDFT, LNFP I, 3'-FL, LNFP II	Sono stati individuati 3 gruppi; il primo esibisce tutti gli HMO fucosilati, il secondo ha una carenza di strutture α 1,2-fucosilate; il terzo mostra sia gli HMO α 1,2, che α 1-3-fucosilati.
Villasenor et al. 2014	- Madri che hanno partorito a termine	Sviluppo di un metodo con singola fase di estrazione per caratterizzare il HBM nei primi quattro mesi e caratterizzazione delle differenze nella composizione del latte nel primo mese.	Acido linoleico, acido palmoleico, acido oleico, LPE, acido gluconico, acido idrossiadipico, lisopiridi, α -tocoferolo, fosfolipidi, colesterolo, fucosio, acido D-glucosaminico	La concentrazione di acido palmoleico, acido oleico aumenta dopo il parto, i fosfolipidi, colesterolo e α -tocoferolo si riducono.
Urbaniak et al. 2014	- Madri che allattavano sotto chemioterapia per Linfoma di Hodgkin - Madri sane	Influenza della chemioterapia sul microbiota e sul metabolismo del HBM.	DHA, PUFA, inositolo, arabinosio, treitolio, acido decanoico, acido miristico, monopalmitina, butanale	Il DHA, PUFA, inositolo si riducono durante la chemioterapia, invece arabinosio, treitolio, acido decanoico, acido miristico si riducono.
Longini et al. 2014	- Madri con parto tra la 23 ^o e la 41 ^o settimana di gestazione - Latte in formula	Confronto tra profilo metabolico del latte materno e del latte in formula.	Lattosio, galattosio 1-fosfato e maltosio	La concentrazione di lattosio è più elevata nel latte materno, mentre il galattosio 1-fosfato e maltosio sono più elevati nel latte in formula.
Spevacek et al. 2015	- Madri che hanno partorito a termine - Madri che hanno partorito pretermine	Differenze nel metabolismo del latte materno a termine e pretermine nel primo mese di lattazione.	Lattosio, 2'FL, 3'FL, LNFP I, LNFP II, glucosio, 2-aminobutirato, alanina, camitina, glutammato, istidina, urea, fucosio, isoleucina, lisina, taurina	Nel latte delle madri a termine aumentano il lattosio, 3'FL, glucosio, mentre il fucosio, 2'FL e LNFP III si riducono. Nel latte pretermine la concentrazione di zuccheri non cambia significativamente, a eccezione del lattosio che aumenta.
Wu et al. 2016	- Madri sane	Cambiamenti di composizione del HBM durante lo stadio di lattazione matura.	Alanina, aspartato, lattosio, glutammato, glutamina, maltosio, treonina, citrato, fosfocolina, galattosio	La concentrazione di lattosio, aspartato e glutammato aumentano durante la lattazione, mentre i monosaccaridi, gli oligosaccaridi e il citrato si riducono.

Tabella 6. Sommario degli studi di metabolomica del latte materno (Modificata da Marincola et al. 2015). Abbreviazioni: DHA, acido docosanoico; 2'-FL, 2'-fucosil-lattosio; 3'-FL, 3'-fucosil-lattosio; LNDFH, lacto-N-difucososio; LDFT, lactodifucotetraosio; LNFP, lacto-N-fucopentaosio; LNT, lacto-N-tetraosio; PUFA, monogliceridi; PUFA, acidi grassi polinsaturi.

Il primo studio sul metaboloma del latte materno è stato effettuato da Marincola et al. In questo studio è stata esaminata la composizione del latte materno durante il primo mese di lattazione nelle madri che hanno partorito un neonato pretermine (26-28 settimane) di basso peso. Ai fini di confronto, sono stati analizzati dei campioni di latte in formula. È risultato che il latte materno contiene più alte quantità di lattosio rispetto al latte in formula, il quale invece è più ricco di maltosio; è stato visto che ci sono delle differenze nella composizione del latte a seconda dell'età gestazionale e che nel post partum la composizione del latte cambia il profilo metabolico, in particolare nella composizione dei carboidrati. Inoltre, vi è una differenza qualitativa e quantitativa nella composizione del profilo degli acidi grassi, infatti il latte materno è caratterizzato da più alte concentrazioni rispetto al latte in formula (137).

Anche nello studio di Longini et al. è stata confrontata la composizione del latte materno rispetto al latte in formula. È stato appurato che la concentrazione di lattosio nel latte materno è maggiore, mentre quella di maltosio e galattosio 1-fosfato è più alta nel latte in formula. Inoltre, sono stati confrontati campioni di latte di madri che hanno partorito pretermine e si è visto che esiste una chiara differenza tra i campioni dei nati a 23-25 settimane e quelli nati a 29 settimane, suggerendo quindi differenze nel profilo globale metabolico a seconda dell'età gestazionale. Tuttavia, a causa dell'esiguità dei campioni non è stato possibile eseguire una più dettagliata analisi. È stato inoltre descritto un cambiamento nella composizione del latte nelle prime tre settimane di lattazione (138).

La variazione tempo-correlata del metaboloma del latte materno è stata studiata da Villasenor et al. La concentrazione di molti metaboliti aumenta dopo il parto, come l'acido palmitoleico, acido oleico, fosfogliceridi; altri invece si riducono come fosfolipidi, colesterolo, alfa-tocoferolo (139).

Un altro studio di Urbaniak et al. ha investigato l'influenza della chemioterapia sul latte in donne sotto regime chemioterapico per Linfoma di Hodgkin. I campioni di latte, raccolti in 4 mesi circa, sono stati analizzati e comparati con quelli di donne sane. Sono stati analizzati 226 metaboliti, 12 dei quali differivano in modo significativo dalla settimana 0 alla settimana in cui è iniziata la chemioterapia. I metaboliti che decrescevano erano l'acido docosaesaenoico (DHA), inositolo e altri acidi grassi polinsaturi. Invece, i livelli di arabinoso, treitolo, acido decanoico, acido miristico, 1-monopalmitina e butanale erano alti durante la chemioterapia. Inoltre si è osservato un decremento del Bifidobacterium e degli Stafilococchi coagulasi negativi nelle donne in regime chemioterapico, con una conseguente alterazione del microbiota intestinale del neonato (140).

Una particolare attenzione è rivolta all'analisi metabolomica degli oligosaccaridi del latte (HMO), la terza componente più abbondante dopo il lattosio e i grassi.

Gli oligosaccaridi contengono un core di lattosio legato ad almeno un residuo di glucosio, galattosio, N-acetilglucosamina, fucosio o acido sialico (141).

Sono stati descritti più di 200 HMO ed è noto che ogni donna non sintetizza lo stesso set di oligosaccaridi. Infatti, la composizione di HMO dipende dall'espressione genetica di alcune glicosiltransferasi. Due geni, importanti per la determinazione del profilo di oligosaccaridi che la madre produce, sono il gene Secretorio (Se) e il gene del gruppo sanguigno di Lewis (Le).

Il gene Secretorio (Se) codifica per l'enzima α [1,2]-fucosiltransferasi (FUT2), responsabile dell'aggiunta di fucosio con un legame α 1-2 alla catena oligosaccaridica. Invece, il gene del gruppo sanguigno di Lewis (Le) codifica per l'enzima FUT3, che aggiunge il fucosio con legame α 1-3,4 alla catena.

Per cui in base all'espressione di questi due enzimi FUT2 e FUT3, gli oligosaccaridi possono essere assegnati a quattro fenotipi (142) (143):

- Fenotipo secretorio Le positivo (Se+/Le+);
- Fenotipo secretorio Le negativo (Se+/Le-);
- Fenotipo non secretorio Le positivo (Se-/Le+);
- Fenotipo non secretorio Le negativo (Se-/Le-).

Nello studio di Smilowitz et al. si sono misurati vari metaboliti nel latte di donne che avevano partorito a termine. Sono stati identificati 65 metaboliti tramite spettroscopia di risonanza magnetica. I metaboliti sono stati classificati in zuccheri, aminoacidi e derivati, acidi grassi, vitamine, nucleotidi e altri. In particolare tra gli zuccheri complessi, sono stati studiati gli oligosaccaridi.

Nello studio si è visto che esistono numerose variazioni interindividuali nella composizione dei metaboliti del latte materno. Alcuni metaboliti sono altamente conservati come il lattosio, l'urea, la creatinina, il glutammato, il mioinositolo, il citrato, la valina e pochi oligosaccaridi. Invece vi è una grande variabilità di alcuni metaboliti come 2'-FL, fucosio, LDFT, LNFP, aspartato, lisina, prolina, acetone. Come già citato in precedenza il 2'-FL, il LDFT ed il LNFP I riflettono lo stato

secretorio della madre, perché la loro produzione è conseguente all'azione della fucosiltransferasi, codificata dal gene FUT2. Invece, la presenza di 3'-fucosillattosio e LNFP II è conseguente all'azione della fucosiltransferasi codificata dal gene FUT3. La differente composizione oligosaccaridica del latte materno suggerisce la presenza di diversi fenotipi materni, che regolano la concentrazione degli zuccheri nel latte, e in particolare gli oligosaccaridi (144).

Nello studio di Praticò et al, la spettroscopia di RMN ha rilevato tre differenti profili nei campioni del latte materno. Il gruppo 1 esibiva tutti i segnali degli oligosaccaridi fucosilati; il gruppo 2 aveva una carenza di strutture α 1,2 fucosilate (2'FL, LDFT, LNFP I, e lacto-N-difucoesiosio o LNDFH I); il gruppo 3 mostrava la presenza di oligosaccaridi α 1,2 e α 1,3 fucosilati, e non vi erano altri residui come LNFP I, LNDFH I, e lacto-N-difucoesiosio II (LNDFH II).

Essendo la fucosiltransferasi codificata dal gene secretorio FUT2 (Se), e la FUT3 dal gene del gruppo di Lewis (Le), sono possibili quattro fenotipi: Se+/Le+, Se-/Le+, Se+/Le- e Se-/Le-.

Nello studio di Praticò, il primo gruppo è compatibile con il fenotipo Se+/Le+, il secondo con Se-/Le+ e il terzo con Se+/Le-.

Perciò, grazie alla spettroscopia di risonanza magnetica nucleare si è potuto caratterizzare il profilo metabolico del latte materno tramite l'identificazione di tre differenti classi di fenotipi sulla base del profilo oligosaccaridico. Questo approccio può rappresentare un potente strumento per la valutazione degli effetti delle condizioni pato-fisiologiche delle madri sul latte e dell'influenza della dieta nel metaboloma del latte (145).

Nello studio di Spevacek et al. si è confrontato il latte di madri che hanno partorito a termine e madri che hanno partorito pretermine, evidenziando 69 principali metaboliti. 10 su 15 madri a termine e 10 su 13 madri pretermine sono state classificate come Secretori.

Nel latte delle madri a termine la concentrazione di alcuni carboidrati come il lattosio, 3'-FL e glucosio aumentava, mentre altri come il 2'-FL, 3'-GSL, 6'-SL, LNFP III, fucosio diminuivano. Nel latte pretermine soltanto il lattosio subiva un incremento.

Tra gli aminoacidi subivano un incremento nel latte a termine: l'alanina, carnitina, glutamato, glutamina, mentre nel latte pretermine soltanto l'alanina aumentava la sua concentrazione in modo significativo. Gli acidi grassi sono simili nel latte a termine e pretermine, tranne l'acetone,

il lattato che risultano più elevati nel latte pretermine. Anche la concentrazione dei nucleotidi risulta simile, a eccezione dell'ipoxantina che è più elevata nel latte a termine (146).

Nello studio di Wu et al, si è evidenziato il cambiamento di composizione del latte durante la lattazione. Sono stati identificati 36 metaboliti, e si è visto che vi è una notevole differenza tra il latte raccolto durante il 9° e il 24° giorno, e quello raccolto durante il giorno 31° e 87°. Il metaboloma del latte cambia significativamente durante la fase di lattazione matura, in particolare la concentrazione di lattosio si eleva, mentre i monosaccaridi e oligosaccaridi si riducono. La concentrazione di alcuni importanti aminoacidi importanti per il neurosviluppo, quali il glutammato e l'aspartato, aumenta durante la fase di lattazione.

Il citrato, importante per il suo ruolo come intermediario nel metabolismo energetico della cellula, decresce durante la lattazione. Questo decremento provoca un aumento della secrezione di lattosio, per il bilanciamento della pressione osmotica (147).

Gli HMO svolgono differenti funzioni, in particolare gli oligosaccaridi del fenotipo Secretorio (α 1-2-fucosilati) proteggono contro la diarrea del neonato, inclusa quella causata da *Campylobacter* e *Calicivirus* (148), grazie alle loro specifiche funzioni antiadesive e bifidogeniche, e promuovono la maturazione del tratto intestinale nei neonati pretermine. La riduzione degli oligosaccaridi α 1-2-fucosilati è correlata ad un aumento del rischio di patologie del neonato, perciò questi oligosaccaridi sono fondamentali per la protezione da alcune malattie infettive. Essi possono rappresentare una componente dell'immunità innata, con la quale la madre può proteggere il neonato da patogeni ambientali (149).

Metabolomica del latte materno: l'importanza del fenotipo secretore

3.1 Obiettivi dello studio

Gli obiettivi che si è posto questo studio sono stati:

- ◆ Caratterizzare il metaboloma dei campioni di latte raccolti da una popolazione di madri che hanno avuto figli con ritardi di crescita intrauterino (IUGR), appropriati per età gestazionale (AGA) e grossi per età gestazionale (GEG);
- ◆ Individuare le eventuali differenze metaboliche tra i campioni analizzati;
- ◆ Confrontare lo studio con gli studi precedenti di metabolomica del latte materno.

3.2 Pazienti e metodi

Pazienti

Questo studio è stato condotto su 60 campioni di latte di donne ricoverate presso il reparto di Neonatologia dell'ospedale universitario Areteion di Atene.

Le 60 donne reclutate per lo studio avevano un'età media di 29.5 anni e, tra queste, 25 hanno avuto un parto cesareo singolo e 35 un parto vaginale singolo. Per 7 di queste ultime è stato necessario l'utilizzo di un forcipe.

I neonati erano ripartiti in 27 femmine e 33 maschi, con una media dell'età gestazionale di 39.35 settimane. In base alla classificazione neonatale sono stati individuati 48 AGA (media percentili 42.83), 2 GEG (media percentili 91.5) e 10 IUGR (media percentili 4.8).

I campioni di latte sono stati raccolti durante il 3° o 4° giorno dopo il parto e dopo che il neonato era stato allattato.

Metodi

Preparazione dei campioni, analisi $^1\text{H-NMR}$:

Prima dell'analisi $^1\text{H-NMR}$ i campioni di latte materno sono stati scongelati a temperatura ambiente, filtrati con filtri da centrifuga Amicon Ultra 0.5 ml 10KDa (Millipore, USA), per rimuovere le proteine e i lipidi, e centrifugati a 10000g per 30 minuti a 4°C. Al latte filtrato è stata addizionata un'aliquota di tampone fosfato (0.1M pH 7.4) e TSP come riferimento interno

($\delta=0.00$ ppm). Infine un'aliquota di 650 μ l della soluzione finale è stata trasferita in un tubo NMR (5 mm O.D).

Gli esperimenti $^1\text{H-NMR}$ sono stati acquisiti a 300 K utilizzando uno spettrometro VARIAN UNITY 500, operante alla frequenza di 499.83 MHz. Gli spettri monodimensionali sono stati registrati mediante un esperimento 1D-NOESY. Il segnale dell'acqua è stato soppresso mediante presaturazione durante il primo incremento della NOESY, usando un tempo di miscelamento di 1 ms ed un tempo di irradiazione di 3.5 s. Gli spettri sono stati acquisiti con una finestra spettrale di 6000 Hz, un tempo di acquisizione di 1.5 s un numero di scansioni pari a 256. Ciascun FID è stato processato mediante Trasformata di Fourier, apodizzando il segnale con una funzione esponenziale ("line broadening" di 0.3 Hz) per migliorare il rapporto segnale/rumore. Gli spostamenti chimici dei segnali protonici sono stati riferiti al segnale del riferimento interno (TSP, $\delta=0.00$ ppm).

3.3 Risultati

Al fine di caratterizzare il profilo metabolico del latte materno, è stata utilizzata la metodica PCA (Analisi delle Componenti Principali), che consente di valutare le correlazioni tra le variabili e la loro rilevanza, elaborando un grafico che individua la presenza di raggruppamenti di oggetti simili (clusters) e di oggetti particolari (outliers). È perciò importante per l'indagine preliminare dei dati ottenuti, in quanto evidenzia il manifestarsi della distribuzione degli oggetti.

Come mostrato nei primi 3 grafici, la PCA non ha evidenziato nessun particolare raggruppamento in clusters dei campioni di latte in base alla classificazione neonatale, al sesso del neonato, al centile e alla tipologia del parto.

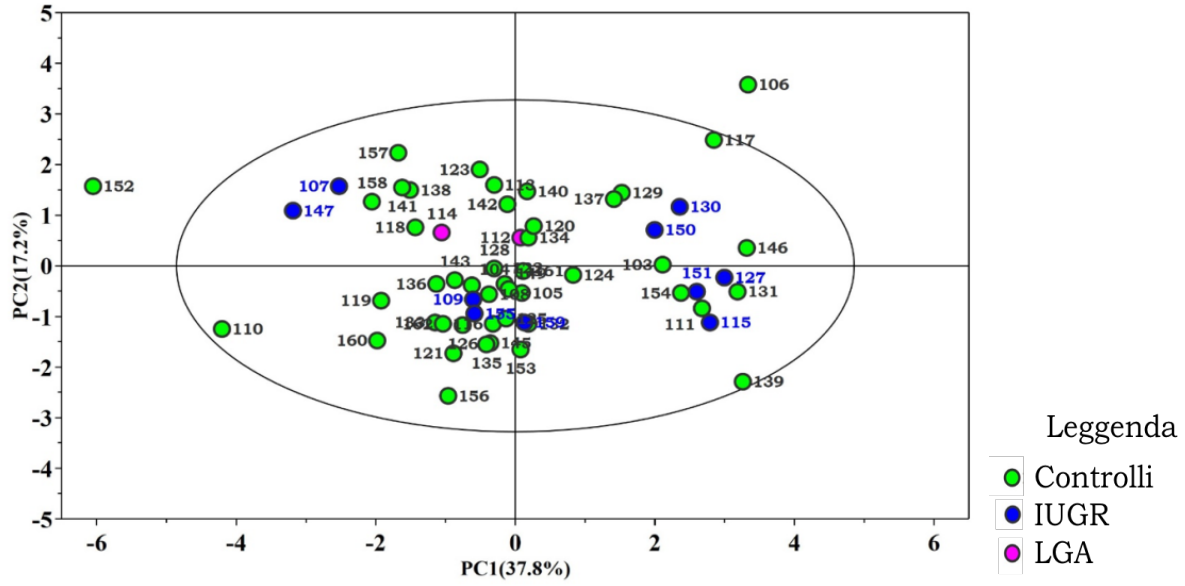


Grafico 1. Analisi mediante metodica PCA del profilo metabolico del latte materno dei neonati AGA, IUGR e LGA.

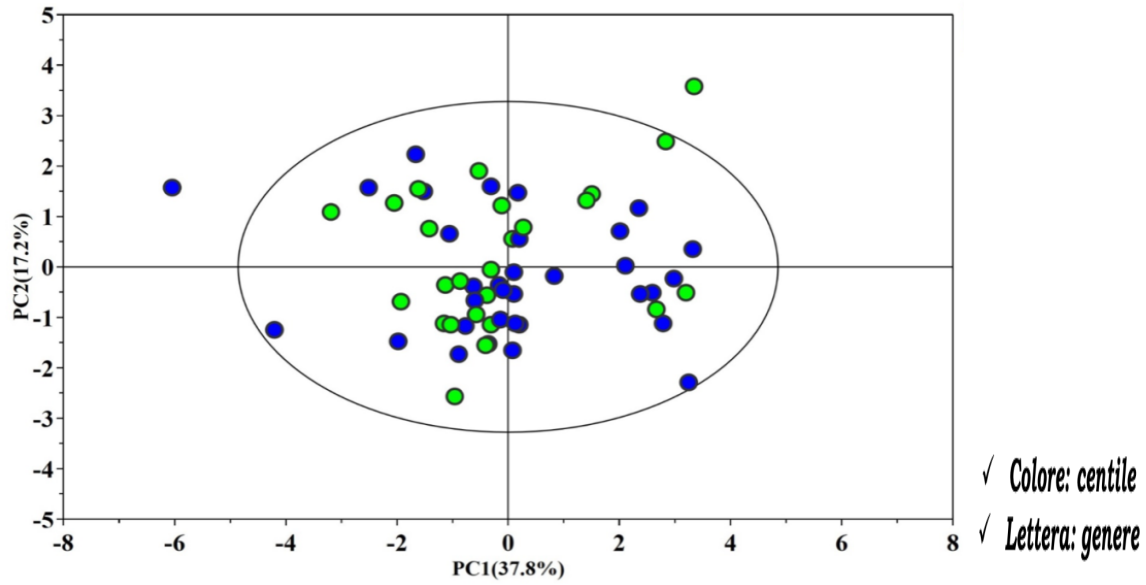


Grafico 2. Analisi mediante metodica PCA del profilo metabolico del latte materno dei neonati in base al centile e al genere.

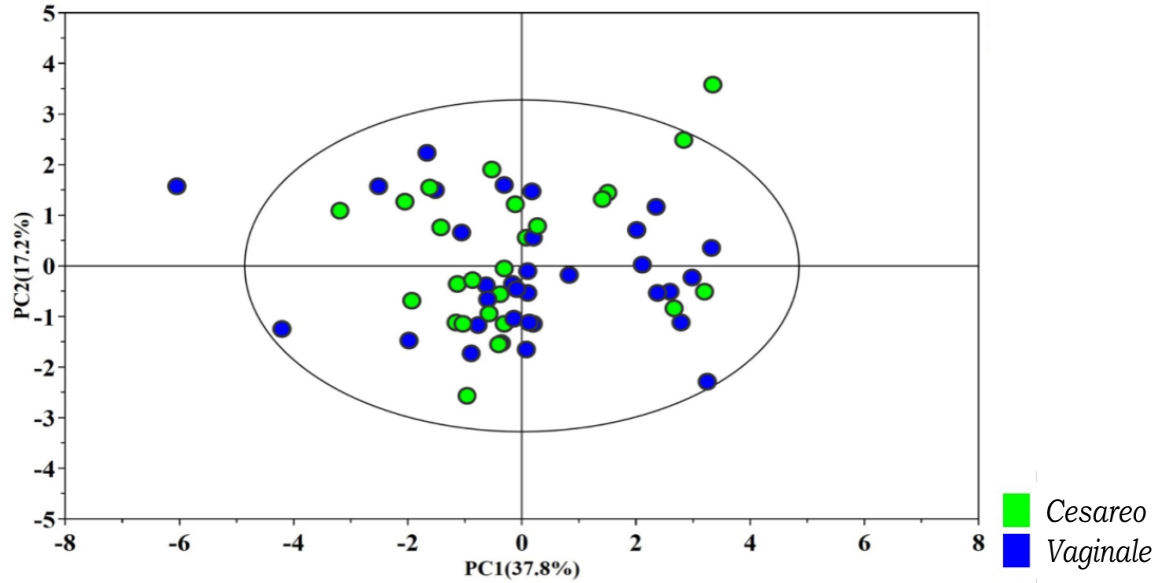


Grafico 3. Analisi mediante metodica PCA del profilo metabolico del latte materno in base alla tipologia del parto.

Un'analisi più approfondita con la metodica 3D-PCA (grafico 4) ha mostrato una separazione dei campioni di latte in due gruppi: un gruppo verde a destra e uno blu a sinistra. Le differenze metaboliche tra i due gruppi sono state successivamente analizzate con la metodica OPLS-DA (Orthogonal projection to latent structure discriminant analysis).

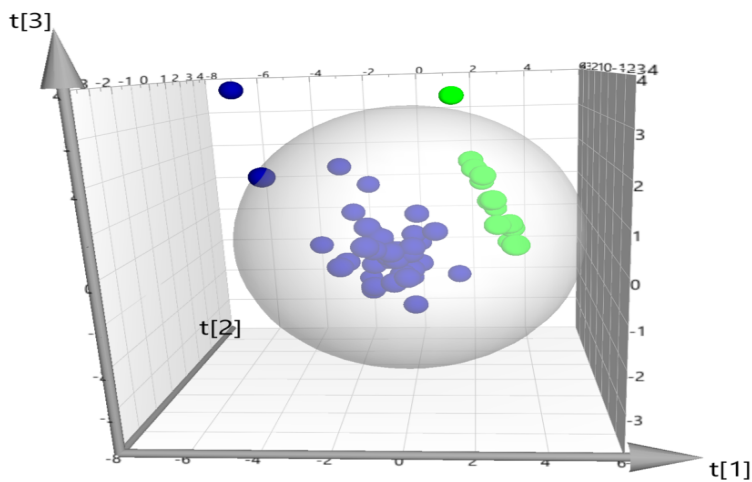


Grafico 4. Analisi mediante metodica 3D-PCA del profilo metabolico del latte materno.

L'analisi discriminante PLS (PLS-DA) viene eseguita per affinare la separazione tra i due gruppi e mostra la formazione di due clusters, che sono stati successivamente analizzati per rivelare le differenze di composizione dei vari metaboliti.

Nel profilo metabolico del gruppo verde mancano completamente le strutture α 1,2-fucosilate (2'FL, LDFT, LNFPI, LNDFHI) e vi è un'alta concentrazione di oligosaccaridi del latte materno (HMO) con residui fucosilati in posizione α 1-3 e α 1-4. Questo risulta essere indicativo dell'espressione del fenotipo Se-/Le+.

Il gruppo blu esibisce tutti gli oligosaccaridi fucosilati e può essere correlato al fenotipo Se+/Le+.

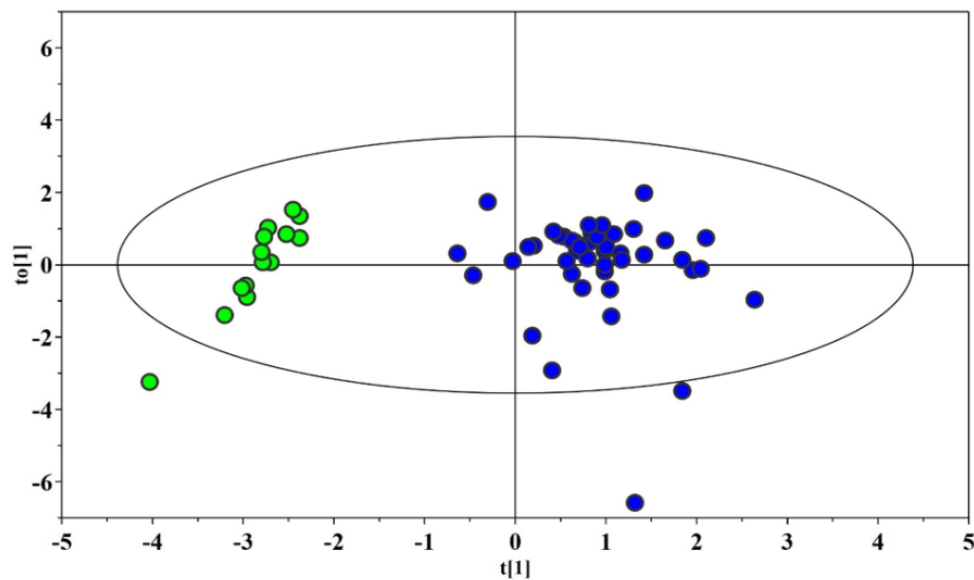


Grafico 5. Analisi mediante metodica PLS-DA del profilo metabolico del latte materno, che mostra la separazione in due gruppi.

La performance è stata valutata usando la correlazione tra il coefficiente R², che è un parametro statistico che esprime la bontà di adattamento, e il coefficiente Q², che esprime il potere predittivo del modello. Entrambi sono compresi tra 0 e 1. Si raggiunge un buon valore predittivo quando Q²>0.5, mentre quando è >0.9 viene considerato eccellente (137).

Nel nostro studio il valore di R² è pari a 0.511 per il primo gruppo, e tale valore è influenzato dall'esiguità del campione. Per il secondo gruppo l'R² è pari a 0.87. Il Q² è pari a 0.87 e riflette un buon potere predittivo.

3.4 Discussione

L'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di identificare il profilo metabolico del latte materno e di individuare le diversità dei campioni in base al fenotipo materno.

Inizialmente, tramite l'analisi PCA non è stato possibile evidenziare nessuna particolare differenza tra i campioni di latte materno analizzati, prendendo in considerazione la differente età gestazionale, il sesso, il percentile del neonato e la tipologia di parto.

Successivamente, l'analisi OPLS-DA è stata in grado di produrre una chiara divisione tra due diversi gruppi:

- il gruppo blu, che esprimeva tutti gli oligosaccaridi fucosilati, sia in posizione α 1-2, che in posizione α 1-3 e α 1-4;
- il gruppo verde, che esprimeva soltanto gli oligosaccaridi fucosilati in posizione α 1-3 e l' α 1-4.

Precedenti studi hanno dimostrato che il pattern di fucosilazione è correlato all'attività di specifici enzimi: FUT2 e FUT3 e a seconda dell'espressione genica di questi due enzimi, sono possibili 4 fenotipi degli oligosaccaridi del latte: Se+/Le+; Se+/Le-; Se-/Le+; Se-/Le-.

Nel nostro studio sono stati riscontrati due fenotipi: il gruppo blu, compatibile con il fenotipo secretore (Se+/Le+) e il gruppo verde, compatibile con il fenotipo non secretore (Se-/Le+); invece nello studio di Praticò et al, sono stati identificati tre fenotipi: Se+/Le+, Se-/Le+ e Se+/Le-

In accordo con gli studi di Praticò et al, Smilowitz et al e Spevacek et al, anche in questo studio è stata riscontrata una maggiore prevalenza del fenotipo secretore. Questo dato è in linea con l'incidenza mondiale, infatti secondo gli studi epidemiologici in Occidente, in Messico e in Giappone l'80% delle donne ha fenotipo secretore, invece in Africa e in Bangladesh la percentuale si riduce al 60% (149). Invece, la prevalenza del gene di Lewis è del 50% nella popolazione generale (150).

Il fenotipo secretore può rappresentare uno strumento per selezionare i tratti genetici che rispondono meglio ai fattori ambientali nella popolazione. Infatti, il latte materno con fenotipo secretore è associato ad una maggiore protezione contro alcuni patogeni come *E. Coli* e *Campylobacter*. Questo fenomeno può spiegare la prevalenza del fenotipo secretore in specifiche regioni dove i patogeni sono endemici. Per esempio, la bassa incidenza di non secretori nelle popolazioni indigene del Messico potrebbe essere una conseguenza della maggiore vulnerabilità dei neonati che ricevono latte contenente pochi oligosaccaridi α 1,2-coniugati (151).

Il set di metaboliti discriminanti che differenziano i fenotipi degli oligosaccaridi del latte sono mostrati in tabella 6 con la rispettiva struttura.

I principali metaboliti sono: 2'fucosil-lattosio (2'FL), lactodifucotetraosio (LDFT), lacto-N-fucopentaosio I (LNFP I), lacto-N-difucoesaosio I (LNFDH I), che riflettono lo stato secretorio materno e sono codificati dal gene FUT2. Invece, il 3'fucosil-lattosio (3'-FL) e il lacto-N-difucoesaosio III (LNFP III) sono codificati dal gene FUT3 e sono presenti nel fenotipo non secretorio Le positivo.

Struttura	Oligosaccaride fucosilato	Fenotipo Se+/Le+	Fenotipo Se-/Le+	Fenotipo Se+/Le-
	2'FL	✓	X	✓
	LDFT	✓	X	✓
	LNFP I	✓	X	✓
	LNDFH I	✓	X	X
	3' FL, LNFPV	✓	✓	✓
	LNFP III	✓	✓	✓
	LNFDH III	✓	✓	X

Tabella 6. Struttura degli oligosaccaridi fucosilati riscontrati nei campioni di latte associati al corrispondente fenotipo (modificata da Praticò et al, 2014).

In accordo ai precedenti studi, la caratterizzazione del metaboloma del latte ha evidenziato una correlazione con il fenotipo espresso dalla madre, tuttavia la limitatezza del campione non ha potuto evidenziare delle significative differenze tra i campioni per età gestazionale, genere e centile del neonato e tipologia di parto.

In accordo agli studi di Praticò et al. e di Smilowitz et al., che hanno dimostrato la presenza di oligosaccaridi fucosilati in posizione α 1,2 (2'-FL, LDFT, LNFP I) nel fenotipo secretorio, e

oligosaccaridi 3'-FL e LNFD II nel fenotipo non secretorio, anche questo studio mostra come i campioni di latte del fenotipo non secretorio presentino il 3'-Fucosil-lattosio e altri oligosaccaridi fucosilati in posizione α 1-3/4, e i campioni di latte del fenotipo secretorio presentino gli oligosaccaridi fucosilati in posizione α 1,2.

In accordo allo studio di Spevacek et al, che ha evidenziato la presenza di oligosaccaridi fucosilati come il 3'FL, 2'FL, LNFP III, anche il nostro studio ha mostrato i suddetti oligosaccaridi nel latte ma non è stata monitorata la variazione di concentrazione nel primo mese di lattazione.

Anche se nello studio non sono stati analizzati i campioni di latte pretermine, il nostro obiettivo sarà quello di ampliare la casistica, analizzando anche il latte materno di neonati pretermine, perché dagli studi effettuati si è visto che il latte delle madri che partoriscono pretermine è immaturo e mostra una riduzione della fucosilazione degli HMO.

I pretermine rappresentano una popolazione a rischio per l'imaturità del sistema immunitario e di altri tessuti che li espone a molteplici infezioni e in particolare alla NEC. Si ha un rischio maggiore di sviluppare questa patologia se si è allattati con formula (152), se il microbiota è predominato da *Proteobacteria* (153) e se il latte materno non presenta gli HMO fucosilati.

Con l'identificazione dei neonati prematuri non secretori, si potrà attuare una nutrizione mirata, in modo che anch'essi godano dei benefici degli oligosaccaridi α 1-2 fucosilati (154).

3.5 Conclusioni

Le importanti funzioni degli oligosaccaridi sono ancora oggetto di studio e grazie alle nuove metodiche analitiche sarà possibile conoscere in maniera più approfondita il loro ruolo nelle vie metaboliche dell'organismo umano. L'applicazione della metabolomica al latte materno è un campo emergente, che esplora la correlazione tra metaboloma e dieta materna, stili di vita, patologie e fenotipi. Anche se è ancora in uno stadio di sviluppo, gli studi citati mostrano come la metabolomica possa essere la chiave per migliorare le conoscenze della complessità del latte materno (155).

In neonatologia, la metabolomica sta facendo dei passi avanti per la sua capacità unica di fornire una lettura funzionale e sistematica del neonato, creando le basi per una cura personalizzata

prenatale e post natale. La definizione dei profili metabolici individuali potrà determinare la probabilità di sviluppare una particolare patologia nell'età adulta e ciò che si apprenderà dagli studi epidemiologici metabolici potrà aiutare a delineare l'interazione tra nutrizione, espressione genica e pressione ambientale, i quali contribuiscono a determinare il rischio fisiologico e patologico dei neonati e dei bambini. Tutto ciò potrà dare l'opportunità di associare una complessa regolazione metabolica con l'eziologia di patologie multifattoriali pediatriche (156).

Il futuro della ricerca potrà riguardare la metabolomica, il microbiota del latte e le cellule staminali. Probabilmente dall'integrazione di questi tre campi si potrà essere in grado di compiere significativi passi avanti nella comprensione della composizione e delle funzioni del latte materno (157).

➤ BIBLIOGRAFIA

- 1) Jenness R. The composition of human milk. *Semin. Perinatol.* 1979 Jul;3(3):225-39.
- 2) Hassiotou F, Hartmann PE. At the Dawn of a New Discovery: The Potential of Breast Milk Stem Cells. *Advances in Nutrition.* 2014;5(6):770-778.
- 3) Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Müller-Werner B, Jelinek J, Stahl B. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr.* 2010 Nov;104(9):1261-71.
- 4) Marincola FC, Dessì A, Corbu S, Reali A, Fanos V. Clinical impact of human breast milk metabolomics. *Clin Chim Acta.* 2015 Dec 7;451(Pt A):103-6.
- 5) Enciclopedia Italiana Treccani. http://www.treccani.it/enciclopedia/neonato_%28Enciclopedia-Italiana%29/ Ultimo accesso: 28/06/2017
- 6) Philip AG. The evolution of neonatology. *Pediatr Res.* 2005 Oct;58(4):799-815.
- 7) Chiswick ML. Schaffer's Diseases of the Newborn. *Archives of Disease in Childhood.* 1984;59(5):493.
- 8) Lussky RC, Cifuentes RF, Siddappa AM. A history of neonatal medicine-past accomplishments, lessons learned, and future challenges. Part 1-the first century. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2005 Apr;10(2):76-89.
- 9) Ballantyne JW. The antenatal and intranatal factors in neonatal pathology: an attempt to explain the peculiarities of the morbid states of the newborn. *Arch Pediatr* 1892;9:339-418.
- 10) Avery ME. Changes in care of the newborn: personal reflections over forty years. *Neonatal Netw.* 1994 Sep;13(6):13-4.
- 11) Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg.* 1953 Jul-Aug;32(4):260-7.
- 12) Pearson HA, Anunziato D, Baker JP, Gartner LM, Howell DA, Strain JE, Bolda Marshall S. Committee report: American Pediatrics: milestones at the millennium. *Pediatrics.* 2001 Jun;107(6):1482-91.
- 13) Organizzazione mondiale della sanità. http://www.who.int/topics/infant_newborn/en/ Ultimo accesso 28/07/2017
- 14) Lewis ML. A comprehensive newborn exam: part I. General, head and neck, cardiopulmonary. *Am Fam Physician.* 2014 Sep 1; 90(5):289-96.

- 15) Battaglia FC, Lubchenco LO. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr*. 1967 Aug; 71(2):159-63.
- 16) Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd M. Intrauterine growth as estimated from liveborn birth-weight data at 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics*. 1963 Nov; 32:793-800.
- 17) Blencowe H, Cousens S, Chou D, et al. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*. 2013;10(Suppl 1):S2.
- 18) Galal M, Symonds I, Murray H, Petraglia F, Smith R. Postterm pregnancy. *Facts, Views & Vision in ObGyn*. 2012;4(3):175-187.
- 19) Tucker J, McGuire W. Epidemiology of preterm birth. *BMJ*. 2004 Sep 18;329(7467):675-8.
- 20) Moghaddam Tabrizi F, Saraswathi G. Maternal anthropometric measurements and other factors: relation with birth weight of neonates. *Nutrition Research and Practice*. 2012;6(2):132-137.
- 21) Lee W, Balasubramaniam M, Deter R. Fetal growth parameters and birth weight: their relationship to neonatal body composition. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009 Apr;33(4):441-6.
- 22) Vayssière C, Sentilhes L, Ego A, Bernard C, Cambourieu D, Flamant C, Gascoin G, Gaudineau A, Grangé G, Houfflin-Debarge V. Fetal growth restriction and intra-uterine growth restriction: guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015 Oct; 193:10-8.
- 23) Sridhar SB, Xu F, Hedderson MM. Trimester-Specific Gestational Weight Gain and Infant Size for Gestational Age. *Krukowski RA, ed. PLoS ONE*. 2016;11(7):e0159500.
- 24) Warkany J, Monroe BB, Sutherland BS. Intrauterine growth retardation. *Am J Dis Child*. 1961 Aug;102:249-79.
- 25) Peleg D, Kennedy CM, Hunter SK. Intrauterine growth restriction: identification and management. *Am Fam Physician*. 1998 Aug; 58(2):453-60, 466-7.
- 26) Sharma D, Shastri S, Farahbakhsh N, Sharma P. Intrauterine growth restriction - part 1. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016 Dec;29(24):3977-87.
- 27) Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr*. 2016 Jul 14; 10:67-83.
- 28) Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, Chrousos GP. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Nov; 997:150-7.
- 29) Hernandez MI, Mericq V. Metabolic syndrome in children born small-for-gestational age. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011 Nov;55(8):583-9.

- 30)McManaman JL, Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Apr 29;55(5):629-41.
- 31)Borst DW, MahoneyWB. Mouse mammary gland DNA synthesis during pregnancy. *J Exp Zool.* 1982 Jun 10;221(2):245-50.
- 32)Arthur PG, Kent JC, Potter JM, Hartmann PE. Lactose in blood in nonpregnant, pregnant, and lactating women. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991 Oct;13(3):254-9.
- 33)Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002 Jan;7(1):49-66.
- 34)Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 1998 Jun;19(3):225-68.
- 35)Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 2000 Oct;80(4):1523-631.
- 36)Crowley WR, Armstrong WE. Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. *Endocr Rev.* 1992 Feb;13(1):33-65.
- 37)Peaker M, Wilde CJ. Feedback control of milk secretion from milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1996 Jul;1(3):307-15.
- 38)Lippuner K, Zehnder HJ, Casez JP, Takkinen R, Jaeger P. PTH-related protein is released into the mother's bloodstream during lactation: evidence for beneficial effects on maternal calcium-phosphate metabolism. *J Bone Miner Res.* 1996 Oct;11(10):1394-9.
- 39)Svennersten-Sjaunja K, Olsson K. Endocrinology of milk production. *Domest Anim Endocrinol.* 2005 Aug;29(2):241-58. Epub 2005 Apr 7.
- 40)Wilde CJ, Knight CH, Flint DJ. Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1999 Apr;4(2):129-36.
- 41)Patton, S., L.M. Canfield, G.E. Huston, A.M. Ferris, and R.G. Jensen. 1990. Carotenoids of human colostrum. *Lipids* 25:159-165.
- 42)Goldman AS, Garza C, Nichols BL, Goldblum RM. Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *J Pediatr.* 1982 Apr;100(4):563-7.
- 43)Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric clinics of North America.* 2013;60(1):49-74.
- 44)Institute of Medicine (US) Committee on Nutritional Status During Pregnancy and Lactation.

Nutrition During Lactation. Washington (DC): National Academies Press (US); 1991.

- 45) Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev.* 2001 Nov;65 Suppl:S3-S18.
- 46) Laryea MD, Leichsenring M, Mrotzek M, el-Amin EO, el Kharib AO, Ahmed HM, Bremer HJ. Fatty acid composition of the milk of well-nourished Sudanese women. *Int J Food Sci Nutr.* 1995 Aug;46(3):205-14.
- 47) Donohoe DR, Garge N, Zhang X, et al. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell metabolism.* 2011;13(5):517-526.
- 48) Peng L, Li Z-R, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *The Journal of Nutrition.* 2009;139(9):1619-1625.
- 49) Tanaka K, Hosozawa M, Kudo N, Yoshikawa N, Hisata K, Shoji H, Shinohara K, Shimizu T. The pilot study: sphingomyelin-fortified milk has a positive association with the neurobehavioural development of very low birth weight infants during infancy, randomized control trial. *Brain Dev.* 2013 Jan;35(1):45-52.
- 50) Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015 Nov;91(11):629-35.
- 51) Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003 Jun;77(6):1537S-1543S.
- 52) Heitlinger LA, Lee PC, Dillon WP, Lebenthal E. Mammary amylase: a possible alternate pathway of carbohydrate digestion in infancy. *Pediatr Res* 1979;13:969–72.
- 53) Lindberg T. Protease inhibitors in human milk. *Pediatr Res* 1979;13:969–72.
- 54) Greenberg R, Groves ML. Human β -casein. Amino acid sequence and identification of phosphorylation sites. *J Biol Chem* 1984;259:5128–32.
- 55) Lönnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 1995;15:93–110.
- 56) Edde L, Hipolito RB, Hwang FF, Headon DR, Shalwitz RA, Sherman MP. Lactoferrin protects neonatal rats from gut-related systemic infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1140–50.
- 57) Chipman DM, Sharon N. Mechanism of lysozyme action. *Science* 1969;165:454–65
- 58) Hurley WL, Theil PK. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients.*

2011;3(4):442-474.

- 59) Jatsyk GV, Kuvaeva IB, Gribakin SG. Immunological protection of the neonatal gastrointestinal tract: the importance of breast feeding. *Acta Paediatr Scand*. 1985 Mar;74(2):246-9.
- 60) Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics*. 1993 Mar;91(3):637-41.
- 61) Ward RE, Niñonuevo M, Mills DA, Lebrilla CB, German JB. In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(6):4497-4499.
- 62) Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Newburg DS. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*. 2001 May;11(5):365-72.
- 63) German JB, Freeman SL, Lebrilla CB, Mills DA. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2008;62:205-18; discussion 218-22.
- 64) Grollman E.F., Ginsburg V. (1967) Correlation between secretor status and the occurrence of 2'-fucosyllactose in human milk. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967 Jul 10;28(1):50-3.
- 65) Bode L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012;22(9):1147-1162.
- 66) Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Adv Exp Med Biol*. 2001;501:299-306.
- 67) Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:143-69.
- 68) Picciano MF. Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am*. 2001 Feb;48(1):53-67.
- 69) Bates CJ, Prentice A. Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. *Pharmacol Ther*. 1994 Apr-May;62(1-2):193-220.
- 70) Von Schenck U, Bender-Gotze C, Koletzko B. Persistence of neurological damage induced by dietary vitamin B-12 deficiency in infancy. *Archives of Disease in Childhood*. 1997;77(2):137-139.

- 71) Leung AK, Sauve RS. Whole cow's milk in infancy. *Paediatrics & Child Health*. 2003;8(7):419-421.
- 72) Jensen RG. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci*. 2002 Feb;85(2):295-350.
- 73) Wilson JF, Lahey ME, Heiner DC. Studies on iron metabolism. V. Further observations on cow's milk-induced gastrointestinal bleeding in infants with iron-deficiency anemia. *J Pediatr*. 1974;84:335-44.
- 74) Martin CR, Ling P-R, Blackburn GL. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*. 2016;8(5):279.
- 75) Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Neto UF, Gopalan S, Hernell O, Hock QS, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz P, Pzyrembel H, Ramirez-Mayans J, Shamir R, Turck D, Yamashiro Y, Zong-Yi D. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005 Nov;41(5):584-99.
- 76) Bhatia J, Greer F; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics*. 2008 May;121(5):1062-8.
- 77) Fomon S. Infant feeding in the 20th century: formula and beikost. *J Nutr*. 2001 Feb;131(2):409S-20S.
- 78) Zetterström R, Ginsburg BE, Lindblad BS, Persson B. Relation between protein intake, plasma valine, and insulin secretion during early infancy. *Klin Padiatr* 1985;197:371-4.
- 79) Fazzolari-Nesci A, Domianello D, Sotera V, Raiha NC. Tryptophan fortification of adapted formula increases plasma tryptophan concentrations to levels not different from those found in breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;14:456-9.
- 80) Sandström O, Lönnerdal B, Graverholt G, Hernell O. Effects of alpha-lactalbumin-enriched formula containing different concentrations of glycomacropeptide on infant nutrition. *Am J Clin Nutr* 2008;87:921-8.
- 81) Lonnerdal B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am J Clin Nutr*. 2014 Mar;99(3):712S-7S.
- 82) Guaraldi F, Salvatori G. Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012;2:94.
- 83) Schiffrin EJ, Blum S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin*

- Nutr. 2002 Aug;56 Suppl 3:S60-4.
- 84)O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*. 2006;7(7):688-693.
- 85)Gritz EC, Bhandari V. The Human Neonatal Gut Microbiome: A Brief Review. *Frontiers in Pediatrics*. 2015;3:17.
- 86)Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014 May 21;6(237):237ra65.
- 87)Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 2008 Apr;159(3):187-93.
- 88)Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, O'Toole GA, Moore JH, Sogin ML, Foster JA, Edwards WH, Palumbo P, Hibberd PL. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2012 Nov;97(6):F456-62.
- 89)Pacheco AR, Barile D, Underwood MA, Mills DA. The Impact of the Milk Glycobiome on the Neonate Gut Microbiota. *Annual review of animal biosciences*. 2015;3:419-445.
- 90)Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999 May;69(5):1035S-1045S.
- 91)Madan JC, Farzan SF, Hibberd PL, Karagas MR. Normal neonatal microbiome variation in relation to environmental factors, infection and allergy. *Current opinion in pediatrics*. 2012;24(6):753-759.
- 92)Gregory KE. Microbiome Aspects of Perinatal and Neonatal Health. *The Journal of perinatal & neonatal nursing*. 2011;25(2):158-164.
- 93)Caicedo RA, Schanler RJ, Li N, Neu J. The developing intestinal ecosystem: implications for the neonate. *Pediatr Res*. 2005 Oct;58(4):625-8.
- 94)Bezirtzoglou E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*. 1997 Apr-Jun;3(2-3):173-7.
- 95)Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):1-10.
- 96)West PA, Hewitt JH, Murphy OM. Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol*. 1979 Apr;46(2):269-77.
- 97)Grice EA, Kong HH, Conlan S, et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science (New York, NY)*. 2009;324(5931):1190-1192.

- 98)Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):361-7.
- 99)Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*. 2007 Mar;119(3):e724-32.
- 100)Maldonado J, Lara-Villoslada F, Sierra S, Sempere L, Gómez M, Rodriguez JM, Boza J, Xaus J, Olivares M. Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in 6-month-old children. *Nutrition*. 2010 Nov-Dec;26(11-12):1082-7.
- 101)Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr*. 2002 May;87(5):405-20.
- 102)Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010 Jul;86 Suppl 1:13-5.
- 103)Thompson AL, Monteagudo-Mera A, Cadenas MB, Lampl ML, Azcarate-Peril MA. Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015;5:3.
- 104)Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science (New York, N.y)*. 2011;334(6052):105-108.
- 105)Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr*. 2009 Dec;21(6):794-800.
- 106)Grantham-McGregor SM, Fernald LC, Sethuraman K. Effects of health and nutrition on cognitive and behavioral development in children in the first three years of life. Part 1: Low birth weight, breastfeeding, and protein-energy malnutrition. *Food Nutr Bull*. 1999; 20:53–75.
- 107)Lucas A, Morley R, Cole TJ, Gore SM. A randomised multicentre study of human milk versus formula and later development in preterm infants. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal edition*. 1994;70(2):F141-F146.
- 108)Sears MR, Greene JM, Willan AR, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Herbison GP, Poulton R. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet*. 2002 Sep 21;360(9337):901-7.
- 109)Gillman MW, Rifas-Shiman SL, Camargo CA Jr, Berkey CS, Frazier AL, Rockett HR, Field

- AE, Colditz GA. Risk of overweight among adolescents who were breastfed as infants. *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2461-7.
- 110)Shu XO, Clemens J, Zheng W, Ying DM, Ji BT, Jin F. Infant breastfeeding and the risk of childhood lymphoma and leukaemia. *Int J Epidemiol*. 1995 Feb;24(1):27-32.
- 111)Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):700-7.
- 112)Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
- 113)Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999 Jan 22;283(5401):534-7.
- 114)Young HE, Black AC Jr. Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004 Jan;276(1):75-102.
- 115)Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006 Mar 31;311(5769):1880-5.
- 116)Henningson CT Jr, Stanislaus MA, Gewirtz AM. 28. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Feb;111(2 Suppl):S745-53.
- 117)Taylor-Papadimitriou J, Shearer M, Stoker MG. Growth requirements of human mammary epithelial cells in culture. *Int J Cancer*. 1977 Dec 15;20(6):903-8.
- 118)Kao CY, Nomata K, Oakley CS, Welsch CW, Chang CC. Two types of normal human breast epithelial cells derived from reduction mammoplasty: phenotypic characterization and response to SV40 transfection. *Carcinogenesis*. 1995 Mar;16(3):531-8.
- 119)Sani M, Hosseini SM, Salmannejad M, Aleahmad F, Ebrahimi S, Jahanshahi S, Talaei-Khozani T. Origins of the breast milk-derived cells; an endeavor to find the cell sources. *Cell Biol Int*. 2015 May;39(5):611-8.
- 120)Cregan MD, Fan Y, Appelbee A, Brown ML, Klopchic B, Koppen J, Mitoulas LR, Piper KM, Choolani MA, Chong YS Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell Tissue Res*. 2007 Jul;329(1):129-36.
- 121)Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell*. 2010 May;23(2):35-40.
- 122)Thomas E, Zeps N, Cregan M, Hartmann P, Martin T. 14-3-3 σ (sigma) regulates proliferation and differentiation of multipotent p63-positive cells isolated from human breastmilk. *Cell Cycle*.

2011 Jan 15;10(2):278-84..

- 123) Hassiotou F, Beltran A, Chetwynd E, et al. Breastmilk Is a Novel Source of Stem Cells with Multilineage Differentiation Potential. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2012;30(10):2164-2174.
- 124) Hosseini SM, Talaei-Khozani T, Sani M, Owrangi B. Differentiation of human breast-milk stem cells to neural stem cells and neurons. *Neurol Res Int*. 2014;2014:807896.
- 125) Beltran AS, Rivenbark AG, Richardson BT, Yuan X, Quian H, Hunt JP, Zimmerman E, Graves LM, Blancafort P. Generation of tumor-initiating cells by exogenous delivery of OCT4 transcription factor. *Breast Cancer Research: BCR*. 2011;13(5):R94.
- 126) Pichiri G, Lanzano D, Piras M, Dessi A, Reali A, Puddu M, Noto A, Fanos V, Coni C, Faa G, Coni P. Human breast milk stem cells: a new challenge for perinatologists. *J Pediatr Neonat Individual Med*. 2016;5(1).
- 127) Hassiotou F, Heath B, Ocal O, Filgueira L, Geddes D, Hartmann P, Wilkie T. Breastmilk stem cell transfer from mother to neonatal organs. *FASEB J*. 2014;28(Suppl 1):216.4.
- 128) Hassiotou F, Geddes DT, Hartmann PE. Cells in human milk: state of the science. *J Hum Lact*. 2013 May;29(2):171-82.
- 129) Barinaga M. Cells exchanged during pregnancy live on. *Science*. 2002 Jun 21; 296(5576):2169-72.
- 130) Gardner RL. Stem cells and regenerative medicine: principles, prospects and problems. *C R Biol*. 2007 Jun-Jul;330(6-7):465-73.
- 131) Faa G, Fanos V, Puddu M, Reali A, Dessi A, Pichiri G, Gerosa C, Fanni D. Breast milk stem cells: four questions looking for an answer. *J Pediatr Neonat Individual Med*. 2016;5(2).
- 132) Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Feb;1(2):153-61.
- 133) Horgan RP, Clancy OH, Myers JE, Baker PN. An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research. *BJOG*. 2009;116(2):173-181.
- 134) Fanos V, Atzori L, Makarenko K, Melis GB, Ferrazzi E. Metabolomics Application in Maternal-Fetal Medicine. *BioMed Research International*. 2013;2013:720514.
- 135) Antonucci R, Atzori L, Barberini L, Fanos V. Metabolomics: the "new clinical chemistry" for personalized neonatal medicine. *Minerva Pediatr*. 2010 Jun;62(3 Suppl 1):145-8.
- 136) Fanos V. Metabolomics, milk-oriented microbiota (MOM) and multipotent stem cells: the future

- of research on breast milk. *J Pediatr Neonat Individual Med.* 2015;4(1).
- 137)Marincola FC, Noto A, Caboni P, Reali A, Barberini L, Lussu M, Murgia F, Santoru ML, Atzori L, Fanos V. A metabolomic study of preterm human and formula milk by high resolution NMR and GC/MS analysis: preliminary results. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 Oct;25(Suppl 5):62-7.
- 138)Longini M, Tataranno ML, Proietti F, Tortoriello M, Belvisi E, Vivi A, Tassini M, Perrone S, Buonocore G. A metabolomic study of preterm and term human and formula milk by proton MRS analysis: preliminary results. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014 Oct;27 Suppl 2:27-33.
- 139)Villaseñor A, Garcia-Perez I, Garcia A, Posma JM, Fernández-López M, Nicholas AJ, Modi N, Holmes E, Barbas C. Breast milk metabolome characterization in a single-phase extraction, multiplatform analytical approach. *Anal Chem.* 2014 Aug 19;86(16):8245-52.
- 140)Urbaniak C, McMillan A, Angelini M, et al. Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome.* 2014;2:24.
- 141)Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:699-722.
- 142)Kumazaki T, Yoshida A. Biochemical evidence that secretor gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1984;81(13):4193-4197.
- 143)Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj J.* 1997 Nov;14(7):795-9.
- 144)Smilowitz JT, O'Sullivan A, Barile D, German JB, Lönnerdal B, Slupsky CM. The Human Milk Metabolome Reveals Diverse Oligosaccharide Profiles. *The Journal of Nutrition.* 2013;143(11):1709-1718.
- 145)Praticò G, Capuani G, Tomassini A, Baldassarre ME, Delfini M, Miccheli A. Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. *Nat Prod Res.* 2014;28(2):95-101.
- 146)Spevacek AR, Smilowitz JT, Chin EL, Underwood MA, German JB, Slupsky CM. Infant Maturity at Birth Reveals Minor Differences in the Maternal Milk Metabolome in the First Month of Lactation. *The Journal of Nutrition.* 2015;145(8):1698-1708.
- 147)Wu J, Domellöf M, Zivkovic AM, Larsson G, Öhman A, Nording ML. NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jan 15;469(3):626-32.

- 148)Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinzen-Derr JK, Farkas T, Chaturvedi P, Pickering LK, Newburg DS. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr*. 2004 Sep;145(3):297-303.
- 149)Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:699-722.
- 150)Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero Mde L, Morrow AL. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology*. 2004 Mar;14(3):253-63. Epub 2003 Nov 24.
- 151)Morrow AL, Meinzen-Derr J, Huang P, et al. Fucosyltransferase 2 non-secretor and low secretor status predicts severe outcomes in premature infants. *The Journal of pediatrics*. 2011;158(5):745-751.
- 152)Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*. 1990 Dec 22-29;336(8730):1519-23.
- 153)Quigley MA, Henderson G, Anthony MY, McGuire W. Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD002971.
- 154)De Leoz MLA, Gaerlan SC, Strum JS, et al. Lacto N Tetraose, Fucosylation, and Secretor Status are Highly Variable in Human Milk Oligosaccharides From Women Delivering Preterm. *Journal of proteome research*. 2012;11(9):4662-4672.
- 155)Fanos V, Barberini L, Antonucci R, Atzori L. Metabolomics in neonatology and pediatrics. *Clin Biochem*. 2011 May;44(7):452-4.
- 156)Moco S, Collino S, Rezzi S, Martin FP. Metabolomics perspectives in pediatric research. *Pediatr Res*. 2013 Apr;73(4 Pt 2):570-6.
- 157)Fanos V. Metabolomics, milk-oriented microbiota (MOM) and multipotent stem cells: the future of research on breast milk. *J Pediatr Neonat Individual Med*. 2015;4(1).