



Recibido: 8 de noviembre de 2010

Aceptado: 6 de diciembre de 2010

## Inmunofenotipo de células mononucleares aisladas de calostro humano

Patricia Bouchan-Valencia,\* Marco Antonio González-Jiménez,\* Lidia Yuriria Paredes-Vivas,\* Rocio Calixto-González,\* Stephania Vázquez-Rodríguez,\* Rosalba Montaño-Rodríguez,† Sergio Estrada-Parra,§ Arturo Cérbulo-Vázquez\*

\* Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes

† Servicio de Dietética, Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes

§ Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

### RESUMEN

La leche humana no sólo es fuente de nutrientes para el lactante, sino también proveedora de inmunidad humoral. Estudios recientes en modelos animales y observaciones en humanos con inmunodeficiencias demostraron que no sólo anticuerpos sino también células pueden ser transferidos desde la madre al feto o al neonato. El calostro humano contiene cerca de  $5 \times 10^6$  leucocitos por mL, siendo macrófagos y células polimorfonucleares las poblaciones mayoritarias, mientras que linfocitos T, B, o NK sólo representan el 10%. Reportamos el inmunofenotipo de células mononucleares aisladas de siete muestras de calostro. Usando citometría de flujo, se cuantificaron las células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> o CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> que expresaron CD25, CD28, CD45RA, CD45RO, CD69, CD80, CD86, CD94, CD152 o HLA-DR en calostro de mujeres asintomáticas. Nuestros resultados mostraron la presencia de células T con un fenotipo CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hasta en un 40% de la población, lo cual sugiere la presencia de linfocitos con función reguladora. Marcadores clásicos de activación celular como CD45RO<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> o HLA-DR<sup>bright</sup> no estuvieron mayoritariamente representados. Nuestro estudio presenta por primera vez el porcentaje de células T y NKs presentes en calostro con inmunofenotipos positivos para CD80, CD86 y CD94.

**Palabras clave:** Calostro humano, inmunofenotipo, polimorfonucleares, células mononucleares.

### ABSTRACT

Human milk is not only a source of nutrients to the milk-suckle infant but also a supplier of humoral immunity. Using animal models and observation in immunodeficient humans, recent some reports show that not only antibodies but cells could be transfer from mother to fetus or newborns. Human colostrum contains about  $5 \times 10^6$  leukocytes/mL being macrophages and polymorphonuclear leukocytes the most frequent population meanwhile T, B and NK lymphocytes just represent 10% of the population. We report the immunophenotype of mononuclear cells-isolated from seven colostrum samples. Using flow cytometry CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> or CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> that expressed CD25, CD28, CD45RA, CD45RO, CD69, CD80, CD86, CD94, CD152 or HLA-DR were quantified in colostrum from asymptomatic women. Our results showed the presence of T cells with a CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> phenotype up to 40% of the population, suggesting the presence of lymphocytes with potential for regulatory function. Classic markers of cellular activation as CD45RO<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> or HLA-DR<sup>bright</sup> not appear to be largely represented. Our study shows for the first time the percentage of T and NK cells expressed in colostrums which are expressing CD80, CD86 or CD94.

**Key words:** Human colostrum, immunophenotype, polymorphonuclear cells, mononuclear cells.

### INTRODUCCIÓN

La alimentación con leche materna no sólo proporciona al lactante elementos nutricios, sino también factores inmunológicos que regulan la respuesta

immune del lactante; reportes recientes demuestran que no sólo anticuerpos sino también células son transferidas de la madre al lactante alimentado con leche materna.<sup>1-5</sup> El calostro humano contiene cerca de  $5 \times 10^6$  leucocitos por mL, siendo macrófagos y polimorfonucleares las poblaciones celulares predomi-

minantes. Aproximadamente, el 10% de las células presentes en calostro son linfocitos T, B o NKs.<sup>6</sup> Algunos elementos en la leche pueden generar activación linfocitaria como lo demuestran algunos reportes; por ejemplo, la leche de cabra induce la síntesis de citocinas pro y antiinflamatorias, además de favorecer la síntesis de óxido nítrico *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).<sup>7</sup> Así mismo, se ha reportado que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que se utilizan para suplementar la leche en presentación de fórmula, son sinérgicas con la actividad mitogénica que ejerce la fitohemaglutinina o la proteína de soya sobre PBMCs estimuladas *in vitro*; adicionalmente, este estudio mostró que la alimentación con leche de fórmula suplementada con ácidos grasos incrementó el número de células con fenotipo de memoria (células CD45RO+) en comparación con lo observado en lactantes alimentados sin dicho suplemento.<sup>8</sup> Otro factor potencialmente inmunomodulador componente de la leche humana es la presencia de cepas probióticas de *Lactobacillus* que expresan actividad inmunomoduladora de PBMC *in vitro*. Tanto *Lactobacillus salivarius* como *Lactobacillus fermentum* inducen el fenotipo activado (expresión de CD69) sobre linfocitos CD8+ (células T) como sobre células CD56+ (NKs) de sangre periférica; tales probióticos provocaron que una mayor proporción de células T CD4+ expresen el fenotipo regulador (CD3+CD4+CD25+foxp3+), indicando qué componentes fisiológicos de la probiota en la leche podrían favorecer las respuestas reguladoras inmunológicas en tejido linfoide asociado a mucosas al aumentar la proporción de células con actividad reguladora, tal como sucede al exponer *Lactobacillus* a PBMC. Se ha reportado que no sólo factores solubles contenidos en la leche, sino las mismas células ejercen una función reguladora de respuestas inmunes, participando en el proceso de adaptación de la flora normal intestinal,<sup>9</sup> y más aún, ejerciendo una función inmunomoduladora en el lactante que limita las respuestas de alergia.<sup>10</sup> El factor de transferencia es un adyuvante inmunológico que se obtiene como un extracto dializable de leucocitos y es especie-específico; clásicamente se obtiene al lisar células de estirpe inmunológica de sangre periférica, pero es posible obtenerlo también de células de leche; se ha reportado que en la leche se encuentran péptidos denominados colostrininas, que parecen tener la actividad inmunorreguladora semejante a la expresada por el factor de transferencia.<sup>11-13</sup>

Con base en las observaciones arriba citadas, podemos concluir que son varios los componentes humorales y celulares (constituyentes o no del sistema inmunológico) presentes en la leche que potencialmente regulan la activación de componentes celulares de la respuesta inmunológica; sin embargo, hasta el momento se desconoce la proporción de células en calostro que expresan marcadores importantes en el proceso de activación linfocitaria como lo son CD25, CD45RA, CD45RO y CD69; el presente trabajo propone realizar la inmunofenotipificación de las células contenidas en leche para posteriormente realizar estudios funcionales que definan las acciones potenciales de las células de estirpe inmunológica en la leche humana.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Colección de muestras de leche humana

Las muestras de calostro fueron colectadas usando recipientes de vidrio estériles, previa asepsia de la glándula mamaria. Las muestras se procesaron dentro de la primera hora después de su obtención. Se incluyeron pacientes atendidas en nuestro instituto que firmaron la hoja de consentimiento informado de acuerdo a los lineamientos del Comité de Ética del INPer (proyecto número: 212250-21031).

### Obtención de la suspensión celular a partir de las muestras de leche de calostro humano

Se analizaron siete muestras de calostro, y de ellas se aislaron los componentes celulares a partir de la muestra diluida (1:10 en solución salina fisiológica -SSF-); después de realizar dos lavados celulares las muestras fueron centrifugadas a 3,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, decantando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en 500 µL de SSF, verificando la viabilidad celular y usando el método de exclusión con azul trípano y cuenta utilizando el sistema de conteo celular automático Countess (Invitrogen, C10281). Las muestras se procesaron a más tardar una hora después de ser colectadas.

### Tinción celular

Una alícuota de la suspensión celular obtenida fue resuspendida en buffer de fosfatos (PBS, pH 7.2), y ex-

tendida a manera de frotis sobre un portaobjetos, y posteriormente teñida con hematoxilina/eosina para luego ser analizada utilizando microscopía óptica convencional.

Las células en suspensión celular ( $1 \times 10^6$  células por mL) se incubaron con 3 mL del anticuerpo monoclonal correspondiente conjugados con diferentes fluorocromos en tubos de polipropileno de fondo redondo (Falcon 352058, BD); los fenotipos fueron evaluados empleando los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD3-PCy5 (BD, 555341), anti-CD4-FITC (BD, 555346), anti-CD8-FITC (BD, 555366), anti-CD19-PCy5 (BD, 555414), anti-CD16-FITC (BD, 555406), anti-CD56-PCy5 (BD, 555517); anti-CD25-PE (BD, 555432), anti-CD28-PE (BD, 555729), anti-CD45RA-PE (BD, 555489), anti-CD45RO-PE (BD, 555493), anti-CD80-PE (BD, 557227), anti-CD86-PE (BD, 555658), anti-CD94-PE (BD, 555889), anti-CD152-PE (BD, 555853), anti-HLA-DR-PE (BD, 347367), anti-CD69-PE (BD, 555531). Las muestras se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo, se adicionaron a las muestras 250  $\mu$ L de solución de lisis, incubándola durante diez minutos a temperatura ambiente en oscuridad; las muestras fueron entonces lavadas adicionando 1 mL de SSF y centrifugadas a 3,000 rpm por 5 minutos a 4 °C y posteriormente decantando el sobrenadante y resuspendiendo el paquete celular en 500  $\mu$ L de SSF; finalmente, las muestras fueron analizadas usando un citómetro de flujo FC500 Beckman Coulter.

### Adquisición y análisis de datos

Las muestras se adquirieron y analizaron usando el programa CXP (Beckman Coulter). El ajuste de los

voltajes de los parámetros FL1, FL2, FL4 se realizó hasta obtener los niveles basales de fluorescencia usando los tubos sin teñir y control de isotipo. Se empleó el parámetro FL4 (PECy5) contra granularidad para seleccionar las células positivas para los marcadores de células T, B y K; se adquirieron 10,000 eventos.

### Análisis estadístico

Cada una de las variables fueron analizadas mediante estadística descriptiva, con determinación de frecuencias, proporciones, promedios y desviación estándar de cada marcador de superficie y población celular identificados.

## RESULTADOS

### Pacientes

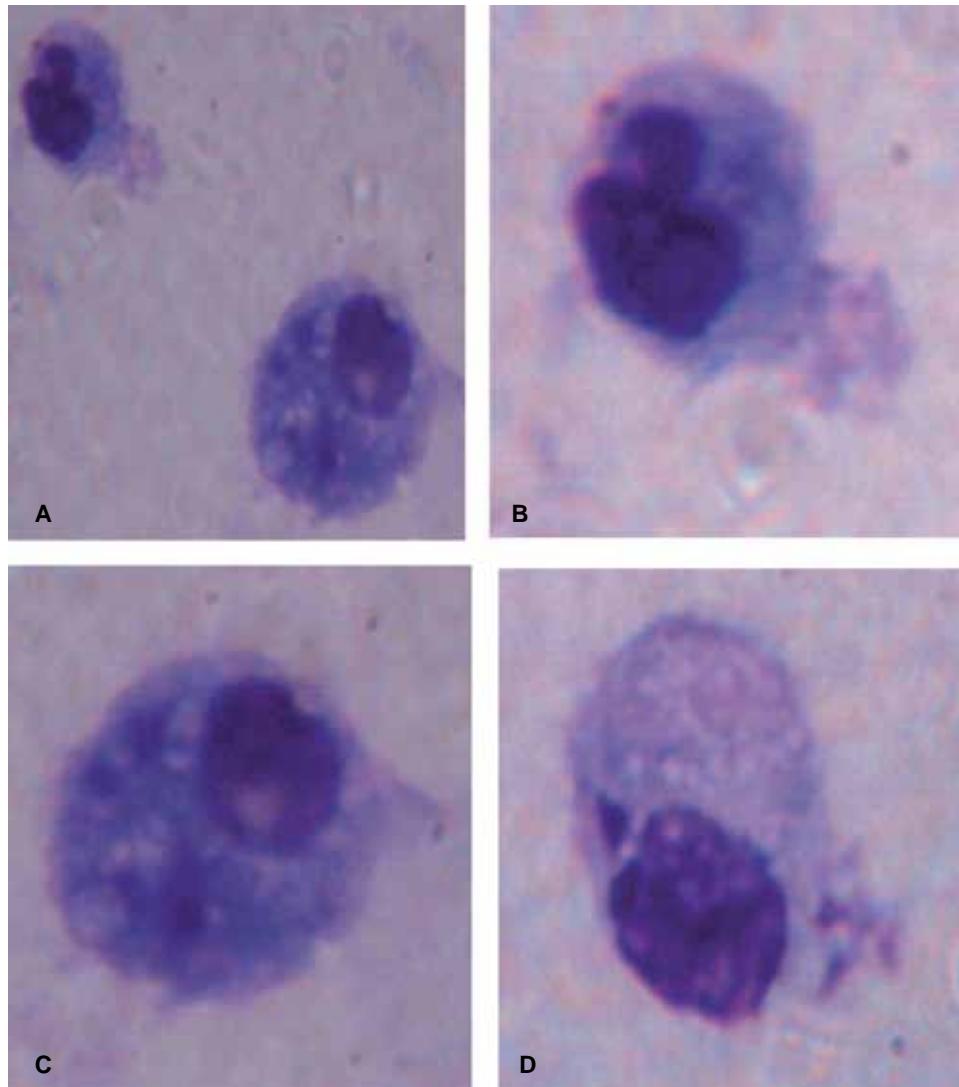
El calostro (día 1 postparto, 0.5 a 5.0 mL) fue colectado de siete mujeres sanas sin evidencia de mastitis o infección durante el último trimestre de su embarazo. Las características clínicas de las pacientes se muestran en el cuadro I. Cuatro de las muestras estudiadas (57.1%) se obtuvieron de mujeres con su primera gesta, y con producto único de embarazo nacido después de las 37 semanas de gestación (SDG).

### El calostro humano contiene células con morfología leucocitaria

La figura 1A-D muestra imágenes de leucocitos aislados de calostro; las células se obtuvieron como se describe en material y métodos. La figura 1A

**Cuadro I. Características clínicas de la población en estudio.**  
Los valores son expresados como la media, desviación estándar e intervalo.

Características	Media ± DS	Intervalo
Edad de la madre	27 ± 8	16 - 39
Peso del producto (g)	2,952 ± 578	1,990 - 3,575
Semanas de gestación (FUM)	39 ± 1.2	37 - 40.1
Militros de calostro en ( $\mu$ L)	2,529 ± 1,770	500 - 5,000
Día de la toma de calostro después del parto	1 ± 0.0	1 - 1



**Figura 1.** Morfología representativa de células en calostro humano. En el panel A se muestran células con morfología linfoide y mieloide. El panel B muestra un acercamiento de la célula con morfología linfoide. Los paneles C y D muestran acercamientos de células con morfología mieloide.

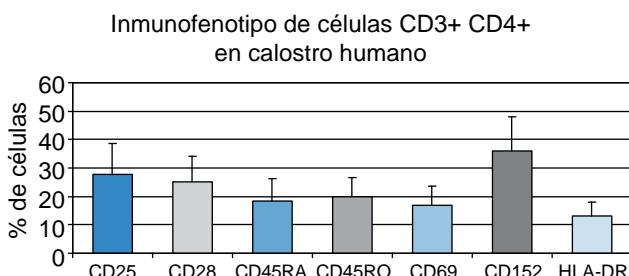
muestra la presencia de células con fenotipo linfoide o mieloide; de ambos tipos celulares puede apreciarse la característica, disposición y morfología de sus respectivos núcleos y citoplasmas. La figura 1B muestra una célula con morfología linfoide; en ella puede distinguirse que el citoplasma no contiene gran cantidad de organelos con núcleo prominente y no segmentado. La figura 1C muestra una célula con morfología mieloide; en ella se puede apreciar una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma con núcleo prominente no segmentado. La figura 1D muestra un segundo tipo de células con fenotipo mieloide,

con una gran cantidad de citoplasma y la presencia de vacuolas citoplásmicas claras y en gran número. Las imágenes mostradas son representativas de lo analizado en el resto de las muestras.

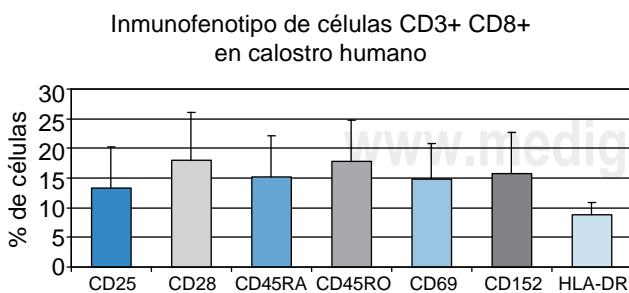
La figura 2 muestra el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Th) aislados de calostro que expresan diferentes marcadores en superficie; entre un 10 a 50 % de la población analizada expresaron los marcadores analizados. La molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-DR) fue detectada hasta en un 10 % de los linfocitos Th, mientras que la molécula CTLA-4 (molécula antígeno 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos,

CD152) fue detectada hasta en un 50% de la población; también se muestra que la molécula CD86 (ligando para CD152) fue detectada hasta en un 45% de la población Th. La población de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fue detectada hasta en un 40% de las células Th analizadas, mientras que el marcador de activación temprano CD69 fue detectado hasta en un 25% de la población.

En la figura 3 se muestran linfocitos CD8<sup>+</sup> (T citotóxicos, Tc) que expresan diferentes marcadores de superficie en células aisladas de calostro; la presencia de los diferentes marcadores fue detectada entre un 5 a 25% de la población. El marcador de superficie celular presente en menor proporción sobre las células Tc fue la molécula HLA-DR, mientras que las moléculas CD86 y CD28 fueron las detectadas en la mayor proporción de las células analizadas (hasta en un 25% de la población Tc); además se muestra que hasta en un 20% el marcador CD69 fue detectado.



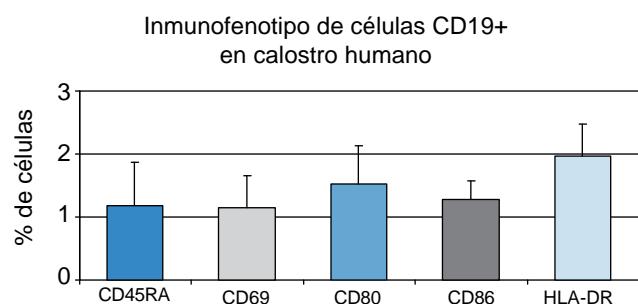
**Figura 2.** Expresión de moléculas de coseñalización (CD28, CD152), isoformas de CD45 (CD45RA, CD45RO), moléculas de activación (CD25, CD69) y moléculas de clase II (HLA-DR) en superficie de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de calostro humano. Los valores son expresados como la media y desviación estándar.



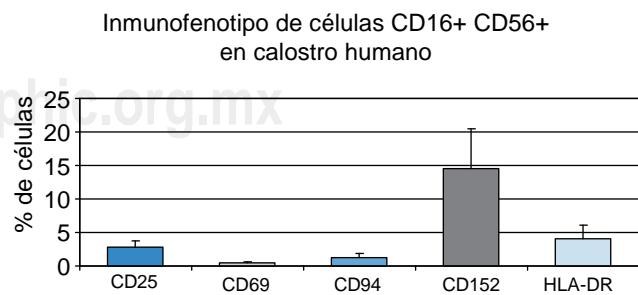
**Figura 3.** Expresión de moléculas de coseñalización (CD28, CD152), isoformas de CD45 (CD45RA, CD45RO), moléculas de activación (CD25, CD69) y moléculas de clase II (HLA-DR) en superficie de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de calostro humano. Los valores son expresados como la media y desviación estándar.

La población de linfocitos B (células CD19<sup>+</sup>) que expresan diferentes marcadores de superficie de células aisladas de calostro también fue analizada (figura 4); la presencia de los diferentes marcadores se detectó en una proporción de entre uno a tres por ciento de la población. El marcador presente en menor proporción sobre las células B fue la molécula CD69 mientras que la molécula CTLA-4 (CD152) fue detectada hasta en un 3% de la población B; adicionalmente, la figura muestra que la molécula CD86 (ligando de CD152) fue detectada hasta en un 2% de la población. La población de células CD19<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> sólo fue detectada en 3% de las células analizadas.

La figura 5 muestra células NKs (Natural Killer) que expresaron diferentes marcadores de superficie en células aisladas de calostro; la presencia de estos marcadores fue observada de entre un 1 a 20% de la población. El marcador presente en menor proporción sobre las células NK fue la molécula CD69 (1%) mien-



**Figura 4.** Expresión de moléculas de coseñalización (CD80, CD86), isoforma de CD45 (CD45RA), moléculas de activación temprana (CD69), moléculas de clase II (HLA-DR) en superficie de linfocitos B de calostro humano. Los valores son expresados como la media y desviación estándar.



**Figura 5.** Expresión de CD25, CD152, CD69, HLA-DR y CD94 en superficie de células NK de calostro humano. Los valores son expresados como la media y desviación estándar.

tras que la molécula CTLA-4 (CD152) fue observada hasta en un 20% de la población NK; adicionalmente, la figura muestra que la molécula CD86 (ligando de CD152) fue detectada en un 10% de la población. La población de células CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> fue detectada hasta en un 3% de las células analizadas.

## DISCUSIÓN

La leche materna contiene una mezcla de diversos elementos tales como glóbulos de grasa, células de estirpe inmunológica y no inmunológica, proteínas solubles como caseína, lactoferrina, IgA, citocinas y péptidos antimicrobianos, entre otros. Con respecto a las células de estirpe inmunológica, podemos decir que el fenotipo de éstas no está totalmente caracterizado; por esto, el estudio fenotípico multiparamétrico debe realizarse para desarrollar estudios de funcionalidad basados en el fenotipo de las diversas subpoblaciones presentes en los diferentes estados de maduración de la leche humana.

El presente estudio reporta los hallazgos del análisis por citometría de flujo de siete muestras de calostro de mujeres en puerperio fisiológico. Nuestros resultados muestran la presencia de células con morfología linfoide y mieloide en calostro (*Figuras 1A-D*); dichas células expresan características morfológicas clásicas de líneas linfoideas y mieloideas fácilmente observables por microscopía óptica convencional; así mismo, fue posible detectar la expresión de marcadores como la molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad HLA-DR (molécula de clase II del MHC), CD25 (receptor  $\alpha$  para interleucina-2 -IL-2R-), la isoforma CD45RO y CD69 en las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y células NK.

La molécula HLA-DR es un subgrupo de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, responsable de la presentación de antígeno a los linfocitos T cooperadores. La expresión de HLA-DR en los linfocitos B en sangre periférica es constitutiva; sin embargo, en calostro sólo pudimos identificar una proporción menor (3%) de la población analizada; hasta el momento desconocemos si existe alguna razón por la cual las células B limiten la expresión de las moléculas de clase II. Por otro lado, se ha postulado que las células T activadas de origen materno pueden compensar tanto la función de las células T inmaduras neonatales, así como promover su maduración.<sup>13,14</sup>

La actividad reguladora de la respuesta inmunológica puede ser ejercida por linfocitos T reguladores (Treg) con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>; estas células suprimen la activación-proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, vía un mecanismo que requiere el contacto célula a célula a través de su molécula CTLA-4 y su ligando CD86 y el secuestro de la producción de IL-2 induciendo anergia celular. En nuestro estudio observamos hasta un 40% de una población celular con fenotipo CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, característico de células reguladoras; este resultado sugiere la presencia de células con actividad reguladora en la leche humana, aunque hasta el momento desconocemos si estas células son capaces de ejercer efecto inhibitorio de la activación de células T; estos estudios están en curso de ser realizados en nuestro laboratorio.

El marcador denominado como antígeno común leucocitario (CD45) ha sido empleado para definir linfocitos T vírgenes o en reposo si expresan en superficie la isoforma CD45RA, o para definir linfocitos T activados si expresan CD45RO en superficie.<sup>15</sup> El número de linfocitos de vírgenes y de memoria es muy estable. La proporción de células CD45RA (hasta un 80%) es mayor en sangre periférica de recién nacidos que en sangre periférica de adultos, mientras que en adultos la población CD45RO (hasta en un 70%) es mayor que la detectada regularmente en recién nacidos. Se sabe que los linfocitos vírgenes CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, sintetizan gran cantidad de interleucina-2 (IL-2) mientras que los linfocitos de memoria CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> producen interferón gamma (IFN $\gamma$ ), interleucina-4 (IL-4), expresión de moléculas de adhesión y actividad cooperadora con linfocitos B; nuestros resultados muestran que a diferencia de lo reportado para las poblaciones en sangre periférica los porcentajes de células con fenotipos CD45RA y CD45RO en células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> o CD3CD8 son muy similares (*Figuras 2 y 3*). Desconocemos si la presencia de células CD45RO es derivada de un reclutamiento de este tipo de células en la glándula mamaria o si el fenotipo de memoria es adquirido en la mama y así expresado en el calostro humano.

La molécula CD69 ha sido identificada como el marcador de activación temprana en los linfocitos activados por citocinas, mitógenos o inducida por la estimulación del complejo TCR. Una vez que la molécula CD69 se expresa, actúa como coestimuladora mediante una mayor actividad del factor de transcripción AP-1, que se considera juega un papel

importante en los eventos tempranos de la activación de los linfocitos T y su posterior proliferación. Nuestros resultados muestran que la expresión del marcador CD69 no es mayoritaria en células de calostro, sugiriendo que éstas no dependen de la vía de estimulación por CD69 para realizar función efectora.

Para la activación de linfocitos T es necesaria la interacción molecular de la proteína de superficie CD28 en la célula T con las moléculas CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) en la superficie de células presentadoras de antígeno. Apenas unas cuantas horas después de iniciado el proceso de activación en las células T la molécula CD152 (CTLA-4) se expresa en superficie. CD152 tiene mayor afinidad por CD80 y CD86 que CD28. La molécula CD28 promueve la producción de IL-2, expansión clonal entre otras funciones efectoras, mientras que CTLA-4 promueve la anergia con una baja producción de IL-2. Nosotros observamos que una alta proporción de las células contenidas en calostro humano expresan tanto CTLA-4 como CD86, lo que sugiere la presencia de células preactivadas en calostro que podrían colonizar el tubo digestivo del lactante; es posible que estas células que colonizan al huésped ejerzan función reguladora dado su inmunofenotipo.

Las células NK son elementos de la respuesta inmunológica innata y desarrollan citotoxicidad independiente del sistema inmune adaptativo. De un 5 a 20% de las células mononucleares de sangre periférica son NKs; su función citotóxica está regulada por receptores de membrana que inhiben o incrementan su actividad. Los receptores inhibidores pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (tipo I) y de las lectinas tipo C (tipo II). En el presente reporte observamos una proporción de células CD94<sup>+</sup>, que puede asociarse a NKG2A (receptor inhibidor) o NKG2C (receptor activador), tanto en linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células NK sugiriendo que las células NK en calostro podrían ser fuente celular de regulación inmunológica en el lactante.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos hasta el momento son preliminares. Nuestros resultados nos hacen pensar que la subpoblación de linfocitos B y T constituyen un componente celular menor en calostro humano. En calostro humano la presencia de células NK es mayor comparada a la de linfocitos B y T y constitu-

ye el componente celular linfocitario predominante (mayor de 10 veces de lo observado para células T y B). La presencia de hasta un 60% de la población de células T con un fenotipo CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sugiere la presencia de linfocitos Treg. Marcadores clásicos de activación celular como CD45RO, CD69 o HLA-DR<sup>bright</sup> no parecen estar mayoritariamente representados en las poblaciones celulares analizadas; por otro lado, moléculas CTLA-4 y CD86 podrían ser mejores para definir estados de activación en linfocitos de calostro.

## REFERENCIAS

1. Wan W, Shimizu S, Ikawa H, Sugiyama K, Yamaguchi N. Maternal cell traffic bounds for immune modulation: tracking maternal H-2 alleles in spleens of baby mice by DNA fingerprinting. *Immunology* 2002; 107: 261-7.
2. Bonney EA, Matzinger P. The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells. *J Immunol* 1997; 158: 40-7.
3. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 705-8.
4. Muller SM, Ege M, Potharst A, Schulz AS, Schwarz K, Friedrich W. Transplacentally acquired maternal T lymphocytes in severe combined immunodeficiency: a study of 121 patients. *Blood* 2001; 98: 1847-51.
5. Zhou L, Yoshimura Y, Huang Y et al. Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology* 2000; 101: 570-80.
6. Jackson KM, Nazar AM. Breastfeeding, the Immune Response, and Long-term Health. *J Am Osteopath Assoc* 2006; 106: 203-207.
7. Jirillo F, Martemucci G, D'Alessandro AG, Panaro MA, Cianciulli A, Superbo M, Jirillo E, Magrone T. Ability of goat milk to modulate healthy human peripheral blood lymphomonocyte and polymorphonuclear cell function: *in vitro* effects and clinical implications. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 870-6.
8. Field CJ, Van Aerde JE, Goruk S, Clandinin MT. Effect of feeding an formula supplemented with long-chain polyunsaturated fatty acids for 14 weeks improves the *ex vivo* response to a mitogen and reduces the response to a soy protein in infants at low risk for allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50: 661-9.
9. Donnet-Hughes A, Pérez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrian EJ. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 407-15.
10. Polte T, Hansen G. Maternal tolerance achieved during pregnancy is transferred to the offspring via breast milk and persistently protects the offspring from allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(12): 1950-8.
11. Kirkpatrick CH, Hamad AR, Morton LC. Murine transfer factors: dose-response relationships and routes of administration. *Cell Immunol* 1995; 164: 203-6.

12. Kruzel ML, Janusz M, Lisowski J, Fischleigh RV, Georgiades JA. Towards an understanding of biological role of colostrinin peptides. *J Mol Neurosci* 2001; 17: 379-89.
13. Sokolowska A, Bednarz R, Pacewicz M, Georgiades JA, Wilusz T and Polanowski A. Colostrum from different mammalian species-A rich source of colostrinin. *International Dairy Journal*. 2008; 18: 204-9.
14. Järvinen Kirsi-Marjut, Juntunen-Backman Kaisu and Soumalainen Hanna. Relation between weak HLA-DR expression on human breast milk macrophages and cow milk allergy CMA in suckling infants. *Pediatric Research* 1999; 45: 76-81.
15. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005; 135: 1-4.

*Correspondencia:*

**Dr. Arturo Cérbulo-Vázquez**

Departamento de Biología Celular,  
Instituto Nacional de Perinatología  
Isidro Espinosa de los Reyes  
Montes Urales Núm. 800,  
Lomas Virreyes,  
C.P. 11000,  
México D.F. México  
Tel. (55) 5520-99-00 ext. 339-340  
E-mail: cerbulo@hotmail.com