

Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrointestinal

Protective effect of human lactoferrin in the gastrointestinal tract

Valterlinda Alves de O. Queiroz¹, Ana Marlúcia O. Assis², Hugo da Costa R. Júnior³

RESUMO

Objetivo: Descrever os mecanismos de ação da lactoferrina humana na proteção de morbidades gastrointestinais.

Fontes de dados: Revisão não sistemática da literatura utilizando como estratégia de busca pesquisa bibliográfica em bases de dados, as quais incluíram SciELO, Lilacs e MedLine entre 1990 e 2011. Os descritores utilizados foram: lactoferrina, leite materno/humano, gastrointestinal e imunidade, nos idiomas português e inglês.

Síntese dos dados: A lactoferrina é a segunda proteína predominante no leite humano, com concentrações mais elevadas no colostro (5,0 a 6,7mg/mL) em relação ao leite maduro (0,2 a 2,6mg/mL). Em contraste, o leite de vaca contém teores inferiores, 0,83mg/mL no colostro e 0,09mg/mL no leite maduro. A lactoferrina desempenha diversas funções fisiológicas na proteção do trato gastrointestinal. A atividade antimicrobiana está relacionada à capacidade de sequestrar ferro dos fluidos biológicos e/ou de desestruturar a membrana de micro-organismos. A lactoferrina possui também a capacidade de estimular a proliferação celular. A ação anti-inflamatória desempenhada pela lactoferrina está associada à capacidade de penetrar no núcleo do leucócito e bloquear a transcrição do fator nuclear Kappa B. Diante da importância da lactoferrina na prevenção de doenças infecciosas em crianças aleitadas ao peito, a indústria vem, por meio da engenharia genética, desenvolvendo tecnologias para expressar esta proteína recombinante humana em plantas e animais, na tentativa de adequar a composição das fórmulas infantis àquela do leite humano.

Conclusões: A lactoferrina humana é um peptídeo com potencial para prevenir morbidades, especialmente às gastrointestinais. Evidências científicas dos efeitos protetores da lactoferrina humana fortalecem ainda mais a recomendação para prática do aleitamento materno.

Palavras-chave: lactoferrina; leite humano; morbidade; trato gastrointestinal.

ABSTRACT

Objective: To describe mechanisms of action of human lactoferrin to protect gastrointestinal morbidities.

Data sources: Nonsystematic literature review using the following databases: SciELO, Lilacs and Medline from 1990 to 2011. The key-words used were lactoferrin, human milk/breastfeeding, gastrointestinal, and immunity, in Portuguese and English.

Data synthesis: Lactoferrin is the second predominant protein in the human milk, with higher concentrations in the colostrum (5.0 to 6.7mg/mL) if compared to mature milk (0.2 to 2.6mg/mL.) In contrast, cow's milk has lower levels, with 0.83mg/mL in the colostrum and 0.09mg/mL in the mature milk. Lactoferrin has several physiological functions to protect the gastrointestinal tract. The antimicrobial activity is related to the ability to sequester iron from biological fluids and/or to destruct the membrane of microorganisms. Lactoferrin also has the ability to stimulate cell proliferation. The anti-inflammatory action exercised by lactoferrin is associated with its ability to penetrate the core of the leukocyte and to block the Kappa B nuclear factor

Instituição: Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil

¹Doutora em Medicina e Saúde pela UFBA; Professora Adjunta da Escola de Nutrição da UFBA, Salvador, BA, Brasil

²Doutora em Saúde Pública pela UFBA; Professora Titular da Escola de Nutrição da UFBA, Salvador, BA, Brasil

³Doutor em Medicina Interna pela UFBA; Professor Adjunto da UFBA e Diretor Geral do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, UFBA, Salvador, BA, Brasil

Endereço para correspondência:

Valterlinda Alves de O. Queiroz
Rua Araújo Pinho, 32 – Canela
CEP 40110-150 – Salvador/BA
E-mail: valterlinda.oliveira@gmail.com

Conflito de interesse: nada a declarar

Recebido em: 12/1/2012

Aprovado em: 29/5/2012

transcription. Given the importance of lactoferrin to prevent infectious diseases for breastfed children, the industry is using genetic engineering techniques to develop the expression of recombinant human lactoferrin in animals and plants, attempting to adjust the composition of infant formulas to that of human milk.

Conclusions: Human lactoferrin is a peptide with great potential for preventing morbidity, especially in the gastrointestinal tract. Scientific evidence of the protective effects of human lactoferrin strengthens even more the recommendation for breastfeeding.

Key-words: lactoferrin; milk, human; morbidity; gastrointestinal tract.

Introdução

Ao nascer, o sistema imunológico da criança é imaturo, o estômago tem menor capacidade de eliminar patógenos e o intestino é desprovido de microbiota. Com base nessas considerações, é razoável prever que a criança seja dependente de proteção exógena. Neste sentido, o leite humano é o alimento ideal pelo fato de possuir compostos imunológicos, nutricionais e digestivos que favorecem a maturidade da mucosa intestinal e compensam a frágil competência para a resposta adaptativa do sistema digestivo e a imaturidade de outros sistemas corporais, contribuindo decisivamente na defesa durante os primeiros dois anos⁽¹⁾.

No período neonatal, os efeitos desfavoráveis da imaturidade imunológica são compensados por mecanismos fisiológicos, como a passagem transplacentária de imunoglobulina G (IgG) da mãe ao feto durante a gravidez e a ingestão de componentes imunológicos do leite humano. O aleitamento materno mantém o elo materno-fetal de proteção após o nascimento, favorecendo a transferência de elementos maternos que modulam o sistema imune. Isso torna a criança imunocompetente durante o período crucial para o desenvolvimento de sua própria imunidade⁽²⁾.

Essa proteção conferida pelo leite humano ocorre devido à presença de uma variedade de proteínas funcionais, incluindo a imunoglobulina A (IgA), a lactoferrina, os fatores de crescimento e as citocinas, que desempenham papel importante no amadurecimento do trato gastrointestinal da criança⁽³⁾.

Dentre os componentes do leite, a lactoferrina destaca-se entre as linhas de defesa contra doenças, especialmente as gastrintestinais⁽⁴⁻⁵⁾. Esta é uma glicoproteína da família da transferrina que tem atraído interesse científico crescente desde o final da década de 1950 devido a sua alta concentração no leite humano⁽⁶⁾ e por suas funções fisiológicas, em especial a ação antimicrobiana,

anti-inflamatória e imunomoduladora do trato gastrointestinal⁽⁷⁾. Assim, esta revisão teve como objetivo descrever, a partir de levantamento bibliográfico, os mecanismos de ação da lactoferrina humana na proteção do trato gastrointestinal.

Fontes de Dados

O levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados eletrônicas *Scientific Electronic Library On-line* (SciELO), *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde* (Lilacs) e *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MedLine), da *National Library of Medicine*, considerando o período de 1990 a 2011. Foram consultadas também as listas de referências dos artigos selecionados para identificar trabalhos clássicos sobre o tema. Por isso, devido à relevância e contribuições, seis artigos publicados fora do período delimitado de busca foram encontrados e incluídos na revisão. Os descritores utilizados na língua portuguesa e seus respectivos correspondentes na língua inglesa foram: lactoferrina (*lactoferrin*), leite materno/humano (*human milk/breastfeeding*), gastrointestinal (*gastrointestinal*) e imunidade (*immunity*). As expressões de pesquisa foram construídas combinando-se os descritores ou utilizando-os de forma isolada.

Síntese dos Dados

Estrutura da lactoferrina

A lactoferrina é a segunda proteína predominante no leite humano⁽⁴⁾, com concentrações mais elevadas no colostro. Cada lactoferrina é composta por um único polipeptídeo com dois lóbulos globulares localizados nas regiões terminais, denominados de lóbulo C (acetil) e N (amino), que são conectados por α -hélice, contendo cada lóbulo um sítio de ligação⁽⁷⁻⁸⁾. Cada um deles consiste de dois sublóbulos denominados N1, N2, C1 e C2⁽⁸⁾.

Cada lóbulo pode se ligar a um metal em sinergia com o íon de bicarbonato, essencial para a ligação do ferro com a lactoferrina. Os metais que comumente podem se relacionar são os íons de Fe^{+2} ou Fe^{+3} , embora outros (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2}) também possam se ligar aos lóbulos da lactoferrina⁽⁹⁾.

Concentrações de lactoferrina no leite humano

A lactoferrina tem distribuição generalizada nos fluidos corporais, especialmente no leite humano⁽⁵⁾. Sua concentração varia entre as espécies animais, tendo o leite humano e de outros primatas as maiores concentrações quando comparados ao da vaca⁽⁶⁾.

A concentração de lactoferrina varia amplamente⁽¹⁰⁾, cerca de 5,0 a 6,7mg/mL no colostro e 0,1 a 2,6mg/mL no leite humano maduro⁽¹¹⁻¹²⁾. Em contraste, o leite de vaca contém

teores inferiores de lactoferrina, com 0,83mg/mL no colostro e 0,09mg/mL no leite maduro⁽¹³⁾.

Digestão da lactoferrina

Estudos têm demonstrado que não só a forma ativa da lactoferrina apresenta atividade biológica. A digestão da lactoferrina produz a lactoferricina, um peptídeo derivado da porção terminal N da lactoferrina com potente atividade contra bactérias patogênicas Gram-positivas e negativas⁽¹⁴⁾. Assim, tanto a lactoferrina quanto o produto da sua digestão apresentam atividade antimicrobiana. É provável que a lactoferricina tenha um efeito bactericida maior do que a lactoferrina devido ao seu tamanho, o que facilita a atuação diretamente sobre a membrana das bactérias⁽¹⁵⁾.

Propriedades antimicrobianas

A diarreia é, habitualmente, uma infecção causada por bactérias, vírus ou parasitas e integra a segunda causa de mortalidade de crianças⁽¹⁶⁾. As infecções por rotavírus são as principais causas da diarreia grave em menores de cinco anos em todo o mundo⁽¹⁷⁾. O rotavírus é responsável por cerca de 527.000 mortes a cada ano e por dois milhões de internações hospitalares por desidratação⁽¹⁸⁾.

Dentre as medidas preventivas reconhecidas para a ocorrência da diarreia está a adoção da prática do aleitamento materno exclusivo nos primeiros seis meses e complementado até pelo menos os dois anos de vida⁽¹⁶⁾. Além de evitar a contaminação veiculada por outros alimentos, a eficácia do aleitamento materno como medida preventiva pode ser atribuída a múltiplos fatores anti-inflamatórios, anti-infecciosos e imunorreguladores presentes no leite humano^(19,20) e que atuam na proteção do lactente⁽²¹⁾. Dentre tais fatores de proteção, a lactoferrina se destaca por suas propriedades antimicrobianas relacionadas principalmente à capacidade de sequestrar o ferro dos fluidos biológicos e/ou desestruturar a membrana de micro-organismos⁽²²⁾, atuando na defesa do organismo contra bactérias, vírus e protozoários. O efeito da lactoferrina sobre as células intestinais pode ser um dos mecanismos contra as infecções entéricas⁽²³⁾.

Efeito antibacteriano

A ação bactericida da lactoferrina é atribuída a dois mecanismos distintos de proteção. O primeiro refere-se ao efeito bacteriostático relacionado à afinidade da ligação da proteína com moléculas de ferro, inibindo o crescimento das bactérias que necessitam deste nutriente⁽²⁴⁾, o que inclui uma variedade de bactérias Gram-positivas e negativas⁽²⁵⁾.

O poder bacteriostático da lactoferrina é dependente do seu estado de saturação⁽²⁴⁾: quanto menor a saturação em ferro, maior é sua capacidade de sequestrar ferro⁽²⁶⁾. Diante disto, deve-se

salientar a importância da lactoferrina presente no leite humano, cuja saturação varia em torno de 5 a 8% e, portanto, apresenta maior capacidade de ação bacteriostática⁽²³⁾ comparada à lactoferrina bovina, cuja saturação varia de 15 a 20%⁽⁸⁾. A lactoferrina com menos de 5% de saturação de ferro é chamada de apolactoferrina (apo), enquanto que a lactoferrina com maior saturação do ferro é denominada de hololactoferrina (holo)⁽⁸⁾. A lactoferrina presente no leite humano predomina na forma apolactoferrina (90%)⁽²⁷⁾.

O segundo mecanismo de proteção contra o crescimento de bactérias atribuído à lactoferrina associa-se a sua interação com a superfície bacteriana⁽²⁸⁾. Estudos da estrutura molecular da lactoferrina demonstram que a proteína tem interação direta com lipídios aniônicos A, componentes de lipopolissacarídeos, que são constituintes da parede celular das bactérias Gram-negativas⁽²⁹⁾. A maior afinidade da lactoferrina com os lipopolissacarídeos está associada com o fragmento da porção terminal N da lactoferrina, ao contrário do C, que tem baixa afinidade⁽³⁰⁾.

Esse processo de interação pode danificar a membrana das bactérias, alterando sua permeabilidade e promovendo a liberação de lipopolissacarídeos^(31,32). Tal alteração facilita a ação da lactoperoxidase e de outras proteínas de defesa sobre a bactéria. A interação da lactoferrina com os lipopolissacarídeos também potencializa a ação dos antibacterianos naturais como a lisozima⁽²⁸⁾.

De acordo com experimentos *in vivo* realizados por Kruzel *et al*, a lactoferrina humana administrada uma hora antes da injeção de lipopolissacarídeos aumentou significativamente a sobrevivência dos ratos, reduzindo a mortalidade de 83,3 para 16,7% nos animais pré-tratados com lactoferrina. Os autores observaram que, no exame histopatológico do intestino, os ratos pré-tratados apresentaram resistência aos danos produzidos pelos lipopolissacarídeos. Nos animais não tratados com lactoferrina humana, observou-se atrofia intensa e edema nas vilosidades intestinais, além de vacuolização epitelial⁽³⁰⁾.

Recentes estudos demonstraram que o efeito dos lipopolissacarídeos na ativação do fator nuclear Kappa B (NF-kB) é insignificante na presença da lactoferrina humana. O NF-kB desempenha papel fundamental na regulação do sistema imune e na resposta inflamatória. Nesse experimento, demonstrou-se, também que a lactoferrina humana pode induzir à ativação de NF-kB em concentrações muito menores do que as encontradas no leite humano. De acordo com os autores, é provável que a lactoferrina humana atue como ativadora do receptor do tipo *toll* 4 (TLR4) no intestino de crianças amamentadas. O TLR4 é capaz de detectar lipopolissacarídeos, sendo importante na ativação do sistema imune inato das crianças⁽³³⁾.

O mecanismo de ação da lactoferrina contra bactérias Gram-positivas tem desempenho similar àquele descrito

para as Gram-negativas, porém com atuação sobre o ácido lipoteicoico, que é um componente da parede celular das bactérias Gram-positivas⁽³⁴⁾. Segundo Leitch e Willcox, a lactoferrina e a lisozima exercem efeito combinado contra bactérias Gram-positivas⁽³⁴⁾.

Efeito antiviral

A lactoferrina é capaz de inibir a replicação de uma ampla variedade de vírus. Os mecanismos de ação antiviral da lactoferrina ainda não foram bem caracterizados. Uma das hipóteses mais aceitas é que a mesma impeça a entrada do vírus na célula hospedeira por bloqueio dos receptores virais ou ligação direta com as partículas do vírus, evitando a infecção⁽⁹⁾.

A lactoferrina tem atuação eficiente no controle de infecções pelo rotavírus, vírus de RNA de dupla hélice da família do *Reoviridae*, que infecta enterócitos maduros. Estas infecções são as causas mais frequentes de gastroenterites em crianças em todo o mundo⁽³⁵⁾.

A lactoferrina na forma apo tem se mostrado mais potente do que na forma holo, porém, a razão para isto não é bem estabelecida. Especula-se que a maioria das enzimas requer íons metálicos para realizar suas funções e a apolactoferrina é mais eficiente na retirada de íons metálicos do ambiente em comparação às formas de lactoferrina saturadas⁽⁹⁾, encontradas em maior proporção no leite de vaca.

Efeito antiparasitário

A função da lactoferrina sobre as doenças parasitárias ainda é pouco explicada. Os resultados dos estudos atribuem-na à ação da lactoferrina sobre a integridade da membrana dos protozoários⁽³⁶⁾. Estudos *in vitro* demonstraram que a apolactoferrina é a proteína do leite com maior atividade contra *Entamoeba histolytica*, uma vez que, ligando-se aos lipídios da membrana do trofozoíto, causaria sua ruptura, com consequentes danos ao protozoário⁽³⁷⁾.

Estimulação da microbiota intestinal benéfica

O desenvolvimento da microbiota intestinal de crianças alimentadas com leite humano é muito diferente daquelas alimentadas artificialmente. As crianças em aleitamento materno exclusivo têm o padrão da microbiota com alta porcentagem de lactobacilos, especialmente *Lactobacillus bifidus*, enquanto o daquelas com leite de vaca ou fórmulas lácteas assemelha-se à microbiota do intestino adulto⁽¹⁾.

O leite humano contém substâncias com atividade prebiótica que estimulam o crescimento de bactérias benéficas. Essas substâncias, denominadas originalmente de fator *bifidus*, podem

promover o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, o que pode proteger o ambiente intestinal ao limitar o crescimento de diversos patógenos devido à diminuição do pH intestinal⁽³⁸⁾.

As evidências indicam que os oligossacarídeos presentes no leite humano têm atividade bifidogênica⁽³⁹⁾, além de proteínas, peptídeos e nucleotídeos também contribuir para o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias no trato gastrointestinal de crianças⁽⁴⁰⁾.

A atividade antimicrobiana da lactoferrina tem efeito benéfico sobre a microbiota intestinal, pois sua ação bacteriostática não compromete o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico, visto que estas têm baixos requerimentos de ferro^(41,42).

A partir dos experimentos *in vitro* realizados por Liepke *et al*, identificou-se, após a digestão do leite materno com pepsina, a presença de peptídeos. Dois destes foram originários da lactoferrina e do componente secretor da IgA. O efeito bifidogênico desses peptídeos foi superior ao N-acetil-glucosamina, um conhecido fator bifidogênico⁽⁴³⁾.

Promoção da proliferação celular

O fator de crescimento epitelial é um polipeptídeo presente no colostro (200µg/L) e no leite maduro (30 a 50µg/L) de humanos; nas secreções bovinas é encontrado em quantidades bem menores⁽⁴⁴⁾.

Segundo Playford *et al*, esse fator de crescimento do leite materno estimula a proliferação e a diferenciação de células intestinais da criança⁽⁴⁵⁾. Os estudos de Corps *et al* demonstraram que a presença isolada do fator de crescimento (purificado) não explica sua atividade mitogênica. Os autores concluíram que o fator de crescimento presente no leite humano juntamente com outros componentes é mais potente na atividade mitogênica do que o fator purificado⁽⁴⁶⁾, indicando existir sinergia entre o fator de crescimento e outros compostos presentes no leite.

Os experimentos de Hagiwara *et al* demonstraram que a lactoferrina tem habilidade para promover a proliferação de células do epitélio intestinal. Ainda de acordo com esses autores, existe uma sinergia entre a lactoferrina e o fator de crescimento epitelial na proliferação celular⁽⁴⁷⁾.

Atividade anti-inflamatória

A lactoferrina tem a capacidade de penetrar no núcleo do leucócito e bloquear a transcrição do NF-kB, que induz à produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL1β), o fator de necrose tumoral alfa (TNFα), a interleucina 6 (IL6) e a interleucina 8 (IL8)⁽⁴⁸⁾.

Além disso, a lactoferrina é um componente da homeostase imunológica, com capacidade de reduzir o estresse oxidativo

em nível molecular, controlando a resposta inflamatória em excesso. O estresse oxidativo ocorre quando a produção das espécies reativas de oxigênio, potencialmente destrutivas, excede as defesas antioxidantes naturais do organismo, resultando em dano celular⁽⁴⁹⁾.

Estudo realizado *in vivo* com concentrações de lactoferrina semelhantes àquelas do colostro humano evidenciou que a lactoferrina bloqueou o desenvolvimento do processo inflamatório induzido pela *Shigella flexneri* no intestino de coelhos⁽⁵⁰⁾.

Os experimentos de Haversen *et al*⁽⁵¹⁾, realizados *in vivo*, confirmam a atividade anti-inflamatória da lactoferrina. Os ratos com colite induzida por dextran sulfato e tratados com lactoferrina humana apresentaram menor quantidade de sangue oculto nas fezes, bem como dano menor na mucosa retal, encurtamento do cólon menos pronunciado, menores níveis séricos de IL1 β , além de menor quantidade de células produtoras de TNF α ⁽⁵¹⁾.

Engenharia genética na produção de lactoferrina

O leite humano protege a saúde da criança, sendo consenso que se trata do alimento ideal e que deve ser oferecido de forma exclusiva nos primeiros seis meses de vida e complementado até pelo menos os dois anos. Porém, muitas crianças, por questões diversas, não se beneficiam do consumo deste alimento, seja de forma total ou parcial. Diante disto, a indústria vem, ao longo do tempo, desenvolvendo tecnologias na tentativa de adequar a composição das fórmulas infantis àquela do leite humano, não somente em relação à composição de nutrientes, mas também de componentes bioativos.

A evolução da ciência genômica e o consequente desvendamento do genoma humano têm favorecido o desenvolvimento de tecnologias que utilizam sequências gênicas, as quais codificam as proteínas do leite humano. Esse avanço tecnológico favorece a expressão de proteínas bioativas de plantas e animais, proporcionando a produção em larga escala de tais componentes⁽⁵²⁾.

A engenharia genética tem possibilitado a expressão de proteínas recombinantes do leite humano em frutas (banana), cereais (arroz e cevada) e tubérculos (batatas). Desses estudos, destaca-se a expressão de lactoferrina no arroz. A utilização deste cereal justifica-se principalmente por não conter

compostos tóxicos, além do baixo poder alergênico, sendo o consumo facilmente assimilável pelas crianças de todo o mundo. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a lactoferrina recombinante humana expressa do arroz possui atividade e estabilidade semelhantes às proteínas nativas⁽⁵³⁾.

Os animais transgênicos também têm sido uma alternativa para expressar componentes bioativos do leite humano. Neste sentido, experimentos demonstraram que a lactoferrina humana recombinante obtida de vacas transgênicas teve idêntica ligação com ferro, quando comparada com a humana, e mostrou-se igualmente eficaz em três diferentes modelos de infecção *in vivo*⁽⁵⁴⁾.

Diante da possibilidade de obtenção em larga escala de componentes bioativos recombinados do leite humano, utilizando plantas e animais geneticamente modificados no enriquecimento de fórmulas infantis, torna-se necessário expandir o volume de estudos para avaliar a eficácia e a segurança desses componentes *in vitro* e *in vivo*.

Conclusões

A lactoferrina humana é um peptídeo natural com grande potencial para prevenir morbidades, especialmente as gastrointestinais, já que apresenta atividade antimicrobiana, de estímulo à proliferação celular, anti-inflamatória e de favorecimento do crescimento da flora bífida.

As evidências científicas dos efeitos protetores da lactoferrina humana sugerem que esta molécula esteja envolvida na proteção do trato gastrointestinal de lactentes amamentados, o que fortalece ainda mais a recomendação à prática do aleitamento materno, especialmente nos primeiros dois anos de vida da criança. Esta fase é mais vulnerável aos danos devido à fragilidade da resposta adaptativa do sistema digestivo e da imaturidade de outros sistemas corporais.

Esforços devem ser empreendidos para desenvolver tecnologias que possibilitem a expressão de proteína recombinante humana em plantas e animais, com o objetivo de beneficiar crianças que, por questões diversas, não podem consumir leite humano, seja de forma total ou parcial.

Referências bibliográficas

1. Newburg DS. Innate immunity and human milk. *J Nutr* 2005;135:1308-12.
2. Chirico G, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C, Gasparoni A. Antiinfective properties of human milk. *J Nutr* 2008;138:1801S-6.
3. Donovan SM. Role of human milk components in gastrointestinal development: current knowledge and future needs. *J Pediatr* 2006;149 (Suppl 1):S49-61.
4. Chierici R, Vigi V. Lactoferrin in infant formulae. *Acta Paediatr* 1994;83:83-8.
5. Lönnnerdal B. Nutritional roles of lactoferrin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:293-7.
6. Lönnnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Ann Rev Nutr* 1995;15:93-110.
7. Ochoa TJ, Cleary TG. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie* 2009;91:30-4.

8. Steijns JM, van Hooijdonk AC. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br J Nutr* 2000;84 (Suppl 1):S11-7.
9. Van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res* 2001;52:225-39.
10. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferrin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2588-98.
11. Hirai Y, Kawakata N, Satoh K, Ikeda Y, Hisayasu S, Orimo H et al. Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1990;36:531-44.
12. Ronayne de Ferrer PA, Baroni A, Sambucetti ME, López NE, Ceriani Cernadas JM. Lactoferrin levels in term and preterm milk. *J Am Coll Nutr* 2000;19:370-3.
13. Sánchez L, Aranda P, Pérez MD, Calvo M. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988;369:1005-8.
14. Newburg DS, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res* 2007;61:2-8.
15. Rodríguez-Franco DA, Vásquez-Moreno L, Montfort GR. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev Latino-am Microbiol* 2005;47:101-11.
16. The United Nations Children's Fund; World Health Organization. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. Geneva: UNICEF/WHO; 2009.
17. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304-6.
18. Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis* 2009;200 (Suppl 1):S9-15.
19. Goldman AS. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:664-71.
20. Hamosh M. Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:69-86.
21. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005;135:1-4.
22. Puddu P, Latorre D, Valenti P, Gessani S. Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals* 2010;23:387-97.
23. Yen CC, Shen CJ, Hsu WH, Chang YH, Lin HT, Chen HL et al. Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection. *Biometals* 2011;24:585-94.
24. Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br Med J* 1972;1:69-75.
25. Levy O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol* 1996;56:263-77.
26. Conneely OM. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr* 2001;20 (Suppl 5):389S-95.
27. Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr* 2010;156 (Suppl 2):S26-30.
28. González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:301.
29. Brandenburg K, Jürgens G, Müller M, Fukuoka S, Koch MH. Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin. *Biol Chem* 2001;382:1215-25.
30. Kruzel ML, Harari Y, Chen CY, Castro GA. Lactoferrin protects gut mucosal integrity during endotoxemia induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation* 2000;24:33-44.
31. Coughlin RT, Tonsager S, McGroarty EJ. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1983;22:2002-7.
32. Ellison RT, Giehl TJ, Laforce FM. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun* 1988;56:2774-81.
33. Ando K, Hasegawa K, Shindo K, Furusawa T, Fujino T, Kikugawa K et al. Human lactoferrin activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *FEBS J* 2010;9:2051-66.
34. Leitch EC, Willcox MD. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. *J Med Microbiol* 1999;48:867-71.
35. Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantonio A, Valenti P, Seganti L et al. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Res* 2002;53:153-8.
36. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40:395-405.
37. León-Sicairos N, López-Soto F, Reyes-López M, Godínez-Vargas D, Ordaz-Pichardo C, de la Garza M. Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, sIgA and lysozyme. *Clin Med Res* 2006;4:106-13.
38. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1537S-43.
39. Newburg DS. Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria? *J Nutr* 1997;127 (Suppl 5):980S-4.
40. Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2007;37:7-36.
41. Petschow BW, Talbott RD, Batema RP. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *J Med Microbiol* 1999;48:541-9.
42. Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Gabrielli O. Prebiotics in human milk: a review. *Dig Liver Dis* 2006;38 (Suppl 2):S291-4.
43. Liepke C, Adermann K, Raida M, Mägert HJ, Forssmann WG, Zucht HD. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur J Biochem* 2002;269:712-8.
44. Read LC, Francis GL, Wallace JC, Ballard FJ. Growth factor concentrations and growth-promoting activity in human milk following premature birth. *J Dev Physiol* 1985;7:135-45.
45. Playford RJ, MacDonald CE, Johnson WS. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr* 2000;72:5-14.
46. Corps AN, Blakeley DM, Carr J, Rees LH, Brown KD. Synergistic stimulation of Swiss mouse 3T3 fibroblasts by epidermal growth factor and other factors in human mammary secretions. *J Endocrinol* 1987;112:151-9.
47. Hagiwara T, Shinoda I, Fukuwatari Y, Shimamura S. Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995;59:1875-81.
48. Hanson LA. Symposium on 'Nutrition in early life: new horizons in a new century'. Session 1: feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc* 2007;66:384-96.
49. Actor JK, Hwang SA, Kruzel ML. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des* 2009;15:1956-73.
50. Gomez HF, Ochoa TJ, Herrera-Insua I, Carlin LG, Cleary TG. Lactoferrin protects rabbits from shigella flexneri-induced inflammatory enteritis. *Infect Immun* 2002;70:7050-3.
51. Haversen LA, Baltzer L, Dolphin G, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. Anti-inflammatory activities of human lactoferrin in acute dextran sulphate-induced colitis in mice. *Scand J Immunol* 2003;57:2-10.
52. Camelo Jr JJ, Martinez FE. Lactoengenharia do leite humano. In: Pereira GR, Leone CR, Alves Filho N, Trindade Filho O, editors. *Nutrição do recém-nascido pré-termo*. Rio de Janeiro: Medbook; 2008. p. 11-29.
53. Lönnerdal B. Expression of human milk proteins in plants. *J Am Coll Nutr* 2002;21 (Suppl 3):218S-21.
54. Van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature Biotechnol* 2002;20:484-7.