

Osteopontina láctea: nuevo ingrediente funcional en las fórmulas infantiles

B. Martín Martínez¹, M.J. López Liñan¹, R. de Castellar Sansó²

¹Unidad de Gastroenterología y Nutrición Infantil. Servicio de Pediatría. Hospital de Terrassa (Barcelona).

²Médico nutricionista. Dirección médica. Laboratorios Ordesa. Sant Boi de Llobregat (Barcelona)

Resumen

La osteopontina (OPN) es una proteína bioactiva cuya ubicuidad y alta variabilidad molecular determinan que asuma funciones muy diversas por todo el organismo, aunque aún no están totalmente establecidas.

La OPN está presente en la leche humana, donde es capaz de interactuar favorablemente con otros componentes de la leche materna, como el calcio, y potenciar la actividad de proteínas como la lactoferrina y la lactoperoxidasa. Sin embargo, también desempeña un papel fundamental en el paso del estado prenatal al posnatal del sistema de respuesta inmunitaria-inflamatoria. La OPN láctea se perfila como un componente bioactivo capaz de emitir señales esenciales para la maduración del sistema inmunitario del lactante y la defensa frente a microorganismos patógenos. Por su similitud estructural y funcional, la adición de OPN de leche bovina a fórmulas infantiles puede promover una actividad fisiológica no nutritiva beneficiosa para el lactante. Se espera disponer de nuevos estudios que consoliden la evidencia y proporcionen datos cuantitativos de estos beneficios.

©2018 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

Palabras clave

Osteopontina láctea, fórmulas infantiles, sistema inmunitario, lactante

Introducción

La leche materna es el patrón de referencia de las fórmulas infantiles. La búsqueda de una fórmula infantil óptima consiste en mimetizar al máximo este modelo de excelencia. Por ello, la formulación de las leches infantiles está en constante progreso. El primer objetivo fue descifrar la composición de la leche materna con el fin de replicar todos sus nutrientes. El siguiente paso consistió en identificar funcionalidades en sus compuestos bioactivos, que no sólo tienen un impacto inmediato sobre el organismo del lactante, sino que también determinan su programación orgánica de cara al futuro, con efectos sobre el

Abstract

Title: Milk osteopontin: a new functional ingredient for infant formulas

Osteopontin (OPN) is a bioactive protein, whose ubiquity and high molecular variability makes it assume very different functions throughout the body, although they are not yet fully established.

Milk OPN is present in human milk and is capable to interact favorably with other breast milk components as calcium, and enhance the activity of proteins such as lactoferrin and lactoperoxidase. But it plays a key role in the change from prenatal to postnatal state of the immune-inflammatory system response. Milk OPN is shaped up as a bioactive component able to send out essential signals for the maturation of the infant's immune system and the defense against pathogenic organisms. Since their structural and functional similarity, the addition of bovine milk OPN to infant formulas could promote a non-nutritive physiologic activity beneficial to the infant. New studies are expected in order to gain solid evidence and provide quantitative data of these benefits.

©2018 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

Keywords

Milk osteopontin, infant formulas, immune system, infant

sistema inmunitario, la función cognitiva y el metabolismo del niño¹.

Vinculado al *early programming* nace un nuevo concepto basado en aprender a interpretar las señales que emite la leche materna. Los avances en el conocimiento de la leche materna han constatado que no es tan sólo un cóctel de bio-componentes, sino un *totum*, un fluido nutritivo vivo, cuyas partes, combinadas en determinadas proporciones, transmiten mensajes al lactante. Se trata de información que marcará el crecimiento y la maduración durante la lactancia y condicionará la salud del niño y del futuro adulto. Por el momento tan sólo intuimos este sistema de señales, pero las

Fecha de recepción: 20/09/18. Fecha de aceptación: 24/09/18.

Correspondencia: B. Martín Martínez. Unidad de Gastroenterología y Nutrición Infantil. Servicio de Pediatría. Hospital de Terrassa. Ctra. Torrebónica, s/n. 08227 Terrassa (Barcelona). Correo electrónico: bmartingastro@hotmail.com

investigaciones más recientes aportan datos que sustentan esta hipótesis².

Hoy sabemos que los primeros 1.000 días –desde la concepción hasta los 2 años de vida– representan una ventana de oportunidad para influir en el metabolismo inmediato y futuro del niño. En este contexto, una alimentación adecuada y óptima es clave para garantizar la salud del individuo a largo plazo. La presencia o ausencia y el déficit o exceso de nutrientes específicos emiten «señales» en el metabolismo y también pueden actuar sobre la expresión génica. Por tanto, la alimentación durante las primeras etapas de la vida estaría involucrada en eventos fisiológicos que pueden desencadenar en el lactante enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, como las alergias, o alteraciones del neurodesarrollo y, en etapas posteriores de la vida, obesidad, síndrome metabólico, patología cardiovascular, diabetes mellitus, etc.³.

Igual que en la leche materna, en una fórmula infantil no deberíamos considerar individualmente sus nutrientes, sino el valor que aportan al conjunto. Los componentes bioactivos de la leche son piezas de un mismo engranaje que interactúan sumando o potenciando efectos para programar la salud futura del lactante.

La osteopontina (OPN) es una proteína que se expresa en múltiples tejidos con funciones muy diversas⁴. Contiene determinadas secuencias de aminoácidos que permiten su reconocimiento por receptores que desencadenarán la cascada de la respuesta inmunitaria e inflamatoria⁵. La isoforma presente en la leche ha demostrado efectos beneficiosos en el desarrollo del sistema inmunitario en estudios realizados en modelos animales y en lactantes⁶. Este hecho, junto con su capacidad de interactuar con otras proteínas bioactivas presentes en la leche materna, hace que se perfile como un biocomponente con participación activa en el sistema de «señales».

Osteopontina: aspectos estructurales

La OPN es una proteína presente en muchos tejidos (hueso, cartílago, riñón, cerebro, médula ósea, vasos, etc.), glándulas (sudoríparas, conductos biliares y pancreáticos) y fluidos (plasma, semen, orina), y es especialmente abundante en la leche materna, el cordón umbilical y el plasma del lactante. También tiene presencia intracelular (se encuentra en macrófagos, linfocitos, células dendríticas y vellosidades del corion)⁴.

Fue identificada por primera vez como una proteína extracelular ubicada en la matriz ósea. A esta proteína se le atribuyó una función puente entre las células óseas y la hidroxiapatita de la matriz ósea, que le valió su nombre⁷. Pero, además de en el remodelado óseo, la OPN está involucrada en múltiples funciones orgánicas, incluida la activación inmunológica, la regeneración de heridas y la angiogénesis⁸.

La OPN láctea tiene un peso molecular de 32 kD (las diferentes isoformas oscilan entre 45 y 75 kD). Está altamente fosforilada y glucosilada. A su cadena de aminoácidos se unen unos

30 residuos de hidratos de carbono, que incluyen 10 residuos de ácido siálico. Contiene la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-aspártico, que permite su reconocimiento por los receptores de numerosas integrinas, implicadas en procesos de migración, adhesión y supervivencia de numerosas células de tipo inflamatorio, incluidos los macrófagos y las células T⁹.

Se codifica por un único gen, pero en el proceso postranscripcional y postraducciona, por acción de diferentes hormonas, citoquinas y factores ambientales, experimenta modificaciones sustanciales que dan lugar a sus diferentes isoformas, lo que explica la alta variabilidad de la proteína resultante y las muy diferentes actividades biológicas en las que puede estar implicada¹⁰.

Existe una variante de OPN secretada por células tumorales en el cáncer de ovario, de próstata y de pecho. Se ha identificado como un posible biomarcador, ya que sus niveles aumentan con la progresión del tumor. Es importante aclarar que se trata de una isoforma estructuralmente muy diferente a la OPN láctea, y no hay ninguna evidencia de que ésta pueda estar involucrada en el desarrollo del cáncer¹¹.

Osteopontina láctea

En 1989 se identificó la presencia de OPN en la leche humana¹² y posteriormente en la leche bovina¹³. La OPN presente en la leche materna es una isoforma que experimenta notables modificaciones postraduccionales que incluyen varias proteólisis, un alto grado de fosforilación y cierto grado de glucosilación, lo que diferencia su estructura y sus actividades respecto a otras isoformas¹⁴.

La OPN láctea humana y bovina guardan una semejanza estructural, ya que comparten hasta un 61% de secuencia de aminoácidos homóloga¹¹ y ambas presentan un alto grado de fosforilación vinculada a los residuos de serina, principalmente, y a los de treonina, en mucha menor proporción¹⁵ (tabla 1).

Schack et al.¹⁶ cuantificaron OPN láctea en leche humana, en leche bovina y en plasma. Tomaron muestras de leche humana procedentes de 29 mujeres lactantes y también muestras de sangre procedentes de lactantes de 3 meses de edad, de adultos y de mujeres gestantes y posgestantes. Observaron que la leche humana contiene una concentración de OPN unas 7-10 veces superior a la de la leche de vaca. También analizaron diversas fórmulas infantiles comercializadas internacionalmente y producidas a partir de leche bovina. Este análisis halló unos contenidos de OPN en dichas fórmulas aún menores que en la leche de vaca intacta (tabla 2). Por último, la concentración de OPN en el plasma del lactante y en el cordón umbilical resultó mucho más elevada que en el sujeto adulto y que en las mujeres gestantes y posgestantes (tabla 3), lo que refuerza la idea de que la OPN puede ejercer funciones biológicas importantes para el lactante¹⁶.

Recientemente, Bruun et al.¹⁷ han publicado un estudio multicéntrico en el que se determinó OPN láctea en muestras pro-

TABLA 1

Características de la osteopontina humana y bovina

Características	Osteopontina humana	Osteopontina bovina
Número de aminoácidos	298	262
Residuos fosforilados	34 ligados a serina 2 ligados a treonina	27 ligados a serina 1 ligado a treonina
Residuos glucosilados	5 ligados a treonina	3 ligados a treonina
Secuencia de anclaje de integrinas	(Arg-Gly-Asp)	(Arg-Gly-Asp)

Tomada de Christensen y Sørensen¹⁵.

TABLA 2

Concentraciones de osteopontina en la leche

	Osteopontina (mg/L)	% sobre la proteína total
Leche humana*:	138	2,1
• China**	266	2,7
• Dinamarca**	100	1,3
• Japón**	185	2,4
• Corea**	216	1,8
Leche bovina*	18	0,05
Fórmulas infantiles*	5,3-13	0,1

*Schack et al.¹⁶. **Bruun et al.¹⁷.

TABLA 3

Concentraciones plasmáticas de osteopontina (ng/mL)

Plasma del lactante (>3 meses) (n= 10)	342
Sangre de cordón umbilical (n= 10)	263
Plasma del adulto (n= 10)	35
Mujeres gestantes/posgestantes (n= 7)	≈*

Tomada de Schack et al.¹⁶.

*Valores no diferentes al plasma del adulto.

cedentes de 629 mujeres lactantes de diferentes países (tabla 2). Se hallaron importantes variaciones en el contenido de OPN entre los países estudiados y, aunque no esclarecieron las causas, los autores lo atribuyeron a factores ambientales, dietéticos y probablemente genéticos.

El calostro no es rico en OPN, pero a los 3-7 días del inicio de la lactancia alcanza las mayores concentraciones de OPN en la leche; luego va decreciendo hasta la mitad del pico máximo, y se mantendrá a este nivel durante el primer año de lactancia¹⁸.

Papel de la OPN láctea sobre el sistema inmunitario

La OPN láctea es resistente al tratamiento térmico hasta 90 °C y, por su acidez, resiste al pH gástrico del lactante y, en parte, a la proteólisis en el tracto intestinal, lo que garantiza su paso de forma intacta por el intestino delgado y, de este modo, preservaría una actividad biológica que le permitiría interactuar con los procesos de maduración inmunitaria que se dan en la

mucosa intestinal¹⁹. Es una proteína sin estructura terciaria, lo que le confiere una mayor flexibilidad estructural, que se ha asociado también a su bioactividad²⁰.

Los estudios experimentales, *in vitro* e *in vivo*, apoyan el papel de la OPN láctea sobre la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria en las primeras etapas de la vida del lactante, concretamente sobre el balance de la respuesta inmunitaria de tipo Th1/Th2.

Los linfocitos T tipo helper Th1 y Th2, ante la presencia de patógenos u otros factores agresores, responden liberando diferentes citoquinas que dirigirán la respuesta inflamatoria e inmunológica. Las citoquinas liberadas por Th1 tienden a dar una respuesta proinflamatoria frente a patógenos intracelulares y ciertas bacterias, pero ante una respuesta Th1 excesiva se lesionarían los tejidos y se perpetuaría una reacción autoinmune. Las citoquinas liberadas por células Th2 actúan contra patógenos extracelulares, y una respuesta Th2 inadecuada o excesiva deriva en reacciones de tipo alérgico y atópico. En una situación inmunológica normalizada hay un equilibrio entre la actividad Th1 y Th2^{21,22}.

Los niños nacen con el sistema inmunitario funcionalmente inmaduro. Durante la gestación, el feto mantiene una respuesta Th1 parcialmente deprimida²¹ para evitar la reacción de rechazo al entorno materno y, tras el parto y durante el primer mes de vida, se da un predominio de la respuesta Th2 sobre la Th1²³. La nueva situación expone al recién nacido a microorganismos externos, por lo que, de forma fisiológica, es necesario que se active la respuesta Th1 y se dé una repolarización del balance Th1/Th2.

La OPN intracelular actúa favorablemente sobre el balance Th1/Th2, induciendo la respuesta tipo Th1 y la producción de citoquinas proinflamatorias^{9,24}. Se ha constatado experimentalmente su función a modo de citoquina activando la respuesta inmunitaria mediada por macrófagos frente a patógenos^{25,26}. Del mismo modo, algunos ensayos *in vitro* confirman la capacidad quimiotáctica sobre los neutrófilos²⁷ y macrófagos, atrayendo las células inflamatorias al lugar de la agresión para estimular la reparación⁴.

También en el caso de la OPN láctea se dispone de datos experimentales que apoyan su actividad sobre el sistema inmunitario. Se ha comprobado que activa los monocitos e induce su migración al foco infeccioso, y que actúa como una opsonina promoviendo la fagocitosis de bacterias²⁸. En cultivos de células intestinales humanas, la OPN láctea indujo la expresión de la citoquina IL-12, que es la que activa la respuesta Th1¹⁶.

Interacciones y sinergias con otros componentes de la leche

La OPN láctea es una proteína ácida, cargada negativamente, glucosilada y fosforilada. Estas características determinan su capacidad de interacción con otros componentes de la leche.

Se ha detectado la presencia de OPN en las micelas de caseína de la leche humana²⁹. Esta interacción con la fracción de caseína impide la unión de caseína con fosfatos, por lo que previene la precipitación de cristales de fosfato cálcico en la leche, que representa una forma no absorbible de calcio. Esta propiedad de OPN láctea ha demostrado *in vitro* que favorece la mineralización ósea³⁰.

La OPN láctea potencia la actividad inmunomoduladora y antibacteriana de la lactoperoxidasa (LPO), la lactoferrina (LF) y la inmunoglobulina M (IgM). En el caso de la LPO y la LF, como son proteínas básicas, establecen una unión electrostática con la OPN por su carácter ácido, mientras que la IgM y la OPN se unen dada su elevada afinidad. Según datos obtenidos *in vitro*, la OPN actúa como transportador de LPO, LF e IgM hasta sus sitios efectivos, potenciando sus funciones inmunomoduladoras y antibacterianas²⁹.

Evidencia preclínica de la osteopontina

En un estudio experimental realizado en ratones OPN deficientes se observó que la respuesta inmunitaria frente a la infección bacteriana y viral empeoraba debido a una falta de respuesta de tipo Th1, y también se comprobó que sólo si estos ratones se exponían a una isoforma de OPN fosforilada, ésta actuaba como mediador en la respuesta proinflamatoria⁵. En otro estudio, realizado en ratones OPN^{-/-} (sin expresión del gen para OPN) a los que se indujo colitis, la administración por

dieta de OPN láctea bovina reducía las manifestaciones inflamatorias en la mucosa colónica, cuantificándose una menor pérdida de sangre por heces, un descenso de neutrófilos plasmáticos y en la mucosa colónica, y una reducción en el reclutamiento de macrófagos y en los niveles de citoquinas proinflamatorias³¹.

Otros estudios experimentales realizados en ratones OPN^{-/-} también demuestran su papel reparador sobre la mucosa intestinal. En ratones con gastroenteritis aguda por inoculación de rotavirus, se comprobó que la infección estimulaba la secreción intestinal de OPN y que la diarrea era más severa en ratones OPN^{-/-}³². Los ratones OPN^{-/-} inoculados con *Mycobacterium bovis* BCG presentaban una mayor carga bacteriana y una mayor reacción granulomatosa, y tardaban más en erradicar la infección que los ratones con OPN²⁵. Entre las características estructurales de la OPN, los autores destacan la participación de sus residuos de ácido siálico en la capacidad antimicrobiana, que limitan la interacción de los patógenos con el epitelio intestinal. Precisamente la OPN láctea es rica en residuos siálicos.

Diversos estudios experimentales, *in vitro* e *in vivo*, aportan evidencias a favor del efecto de la OPN en el sistema nervioso central (SNC). Las lesiones isquémicas o hipóxicas inducidas aumentaban la expresión de OPN en las células gliales, y la administración intranasal o intracraneal de OPN se asociaba a una reducción de la gravedad del daño³³⁻³⁶. De estos experimentos se concluye que la OPN participa en la remielinización después de una lesión, y que modula la reacción de neuroinflamación de manera que protege de la pérdida neuronal y preserva las sinapsis. Esta actividad se ha asociado al reconocimiento de secuencias de aminoácidos específicas de la OPN por parte de los receptores de integrinas que activan la respuesta inflamatoria en el SNC.

La OPN láctea puede tener un efecto protector sobre la mucosa gastrointestinal, preservando su función barrera, según apuntan los resultados de Ge et al.³⁷ en un estudio experimental con ratones a los que se inducía daño hepático por ingesta de etanol. La lesión estimulaba la expresión de OPN en el estómago, el duodeno y el colon, y la suplementación con OPN láctea ejercía un papel protector frente a los efectos hepatotóxicos.

Evidencia clínica de la osteopontina láctea

Lönnerdal et al. llevaron a cabo el primer estudio en lactantes sobre la adición de OPN láctea en fórmulas infantiles, aportando datos prometedores acerca de los potenciales beneficios^{38,39}. Se trata de un ensayo clínico, aleatorizado, controlado con una fórmula convencional y con un grupo de referencia de niños con lactancia materna (n= 80). Participaron 240 lactantes sanos, nacidos a término y menores de 1 mes de vida, que iniciaron la alimentación complementaria entre los 4 y los 6

meses. El seguimiento fue de 6 meses y los niños del grupo en estudio fueron alimentados con dos posibles fórmulas enriquecidas con OPN que aportaban un 100 y un 50% de la concentración estimada de OPN en la leche materna (130 y 65 mg/L, respectivamente). Los niños alimentados con fórmula suplementada con OPN presentaron menos días de fiebre que los niños con fórmula convencional³⁹, y sus niveles de células T y de citoquinas plasmáticas mostraron un perfil más semejante al de los lactantes amamantados, lo que reforzaba la hipótesis de que la OPN ejerce efectos beneficiosos sobre la función inmunitaria^{38,39}.

Además, en los lactantes con fórmulas con OPN se cuantificaron unos niveles plasmáticos de isoleucina, leucina y valina menos elevados que en los lactantes con fórmula convencional³⁹. Considerando el poder insulínico de estos aminoácidos⁴⁰, éste no dejaba de ser un hallazgo interesante a favor de los potenciales beneficios metabólicos de la OPN, sobre los que vale la pena investigar.

Seguridad de la osteopontina láctea

Kvistgaard et al.⁴¹ realizaron diversos estudios preclínicos para comprobar la toxicidad de la OPN láctea, así como su potencial mutagénico. En un test con bacterias no hallaron efectos adversos relacionados con la toxicidad celular ni el poder mutagénico. Tampoco observaron toxicidad oral en ratones con una ingesta diaria de OPN del 0,5, 1 y 2% en la dieta durante 90 días, y descartaron efectos adversos sobre el desarrollo embrionario y la teratogénesis en un estudio con ratas gestantes alimentadas con 620, 1.250 y 2.500 mg/kg/día.

En un estudio experimental⁴², realizado con *macacus rhesus* lactantes, se comprobó que la administración de OPN láctea de origen bovino en concentraciones equiparables a la leche humana no comportaba diferencias significativas en el crecimiento de las crías alimentadas al pecho, con una fórmula estándar o una fórmula con OPN.

Finalmente, Lönnnerdal et al.³⁹, en un ensayo clínico realizado en lactantes sanos, demostraron que la administración de una fórmula infantil enriquecida con OPN láctea de origen bovino, en concentraciones de 65 y 130 mg/L, logra un crecimiento adecuado según los parámetros estandarizados (*z-score*) de peso, talla y perímetro craneal.

Conclusiones

La evidencia científica acumulada hasta el momento va a favor de considerar la OPN láctea como un componente bioactivo de la leche, implicado en la maduración del sistema inmunitario del recién nacido.

La OPN bovina y la OPN humana guardan un parecido estructural y participan en el sistema de señales implicado en la cascada de la respuesta inmunitaria temprana.

Los datos preclínicos obtenidos respaldan el papel de la OPN láctea sobre el balance entre la respuesta inmunitaria Th1/Th2, promoviendo la activación de la respuesta inmunitaria innata tan necesaria desde el inicio de la vida extrauterina. Desde este enfoque, la OPN láctea emite las señales clave para que el organismo del neonato dé el paso de un estado inmunitario e inflamatorio propio de la vida intrauterina a un estado adecuado en la vida extrauterina.

Aunque el primer ensayo clínico con fórmulas enriquecidas con OPN láctea aporta resultados positivos sobre su función inmunomoduladora, se espera disponer de nuevos estudios que consoliden esta evidencia y que exploren los potenciales beneficios de adicionar esta proteína a las fórmulas infantiles.

En todo caso, enriquecer las fórmulas infantiles con OPN láctea a corto plazo ha demostrado que el lactante mantiene un crecimiento adecuado y una buena digestibilidad, y que cumple aspectos de seguridad y tolerabilidad. Y a largo plazo tiene efectos favorables en la maduración del sistema inmunitario y el sistema digestivo, e incluso puede tener repercusiones favorables en el desarrollo metabólico y cognitivo desde edades muy tempranas.

La OPN láctea es un componente bioactivo de la leche materna, que emite mensajes que hasta ahora no habíamos «escuchado». Probablemente en un futuro en que las fórmulas infantiles serán cada vez más biomiméticas a la leche humana, la OPN láctea tendrá un papel clave como ingrediente funcional en el sistema inmunitario del lactante. ■

Bibliografía

1. Koletzko B, Brands B, Grote V, Kirchberg FF, Prell C, Rzehak P, et al; Early Nutrition Programming Project. Long-term health impact of early nutrition: the power of programming. *Ann Nutr Metab.* 2017; 70(3): 161-169.
2. Hinde K, German JB. Food in an evolutionary context: insights from mother's milk. *J Sci Food Agric.* 2012; 92(11): 2.219-2.223.
3. Godfrey KM, Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrin Met.* 2010; 21: 199-205.
4. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(3): 279-303.
5. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.* 2000; 287(5454): 860-864.
6. Demmelmair H, Prell C, Timby N, Lönnnerdal B. Benefits of lactoferrin, osteopontin and milk fat globule membranes for infants. *Nutrients.* 2017; 9(8): E817.
7. Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83(23): 8.819-8.823.
8. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin: a molecule for all seasons. *QJM.* 2002; 95(1): 3-13.

9. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008; 19(5-6): 333-345.
10. Christensen B, Schack L, Kläning E, Sørensen ES. Osteopontin is cleaved at multiple sites close to its integrin-binding motifs in milk and is a novel substrate for plasmin and cathepsin D. *J Biol Chem.* 2010; 285(11): 7.929-7.937.
11. Christensen B, Sørensen ES. Structure, function and nutritional potential of milk osteopontin. *Int Dairy J.* 2016; 57: 1.
12. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG. Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 996(1-2): 43-48.
13. Sørensen ES, Petersen TE. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *J Dairy Res.* 1993; 60(2): 189-197.
14. Christensen B, Nielsen MS, Haselmann KF, Petersen TE, Sørensen ES. Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem J.* 2005; 390(Pt 1): 285-292.
15. Christensen B, Sørensen ES. Osteopontin is highly susceptible to cleavage in bovine milk and the proteolytic fragments bind the $\alpha V\beta_3$ -integrin receptor. *J Dairy Sci.* 2014; 97(1): 136-146.
16. Schack L, Lange A, Kelsen J, Agnholt J, Christensen B, Petersen TE, et al. Considerable variation in the concentration of osteopontin in human milk, bovine milk, and infant formulas. *J Dairy Sci.* 2009; 92(11): 5.378-5.385.
17. Bruun S, Jacobsen LN, Ze X, Husby S, Ueno HM, Nojiri K, et al. Osteopontin levels in human milk vary across countries and within lactation period: data from a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018; 67(2): 250-256.
18. Nagatomo T, Ohga S, Takada H, Nomura A, Hikino S, Imura M, et al. Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. *Clin Exp Immunol.* 2004; 138(1): 47-53.
19. Chatterton DEW, Rasmussen JT, Heegaard CW, Sørensen ES, Petersen TE. In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: research on biological functions. *Trends Food Sci Technol.* 2004; 15(7-8): 373-383.
20. Shipovskov S, Oliveira CL, Hoffmann SV, Schauer L, Sutherland DS, Besenbacher F, et al. Water-in-oil micro-emulsion enhances the secondary structure of a protein by confinement. *Chemphyschem.* 2012; 13(13): 3.179-3.184.
21. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ.* 2000; 321(7258): 424.
22. Sult T. Th1/Th2 balance: a natural therapeutic approach to Th2 polarization in allergy. *Appl Nutr Sci Rep.* 2003; 676(1): 1-7.
23. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune sensing by toll-like receptors in newborns and the elderly. *Immunity.* 2012; 37(5): 771-783.
24. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Comm Signal.* 2009; 3(3-4): 311-322.
25. Nau GJ, Liaw L, Chupp GL, Berman JS, Hogan BL, Young RA. Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. *Infect Immun.* 1999; 67(8): 4.223-4.230.
26. Rittling SR. Osteopontin in macrophage function. *Expert Rev Mol Med.* 2011; 13: e15.
27. Koh A, Da Silva AP, Bansal AK, Bansal M, Sun C, Lee H, et al. Role of osteopontin in neutrophil function. *Immunology.* 2007; 122(4): 466-475.
28. Schack L, Stapulionis R, Christensen B, Kofod-Olsen E, Skov Sørensen UB, Vorup-Jensen T, et al. Osteopontin enhances phagocytosis through a novel osteopontin receptor, the alphaXbeta2 integrin. *J Immunol.* 2009; 182(11): 6.943-6.950.
29. Azuma N, Maeta A, Fukuchi K, Kanno C. A rapid method for purifying osteopontin from bovine milk and interaction between osteopontin and other milk proteins. *Int. Dairy J.* 2006; 16: 370-378.
30. Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 2005; 77(1): 45-54 [Epub 2005 Jul 14].
31. Da Silva AP, Ellen RP, Sørensen ES, Goldberg HA, Zohar R, Sodek J. Osteopontin attenuation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest.* 2009; 89(10): 1.169-1.181.
32. Rollo EE, Hempson SJ, Bansal A, Tsao E, Habib I, Rittling SR, et al. The cytokine osteopontin modulates the severity of rotavirus diarrhea. *J Virol.* 2005; 79(6): 3.509-3.516.
33. Albertsson AM, Zhang X, Leavenworth J, Bi D, Nair S, Qiao L, et al. The effect of osteopontin and osteopontin-derived peptides on preterm brain injury. *J Neuroinflammation.* 2014; 11: 197.
34. Doyle KP, Yang T, Lessov NS, Ciesielski TM, Stevens SL, Simon RP, et al. Nasal administration of osteopontin peptide mimetics confers neuroprotection in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28(6): 1.235-1.248.
35. Meller R, Stevens SL, Minami M, Cameron JA, King S, Rosenzweig H, et al. Neuroprotection by osteopontin in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25(2): 217-225.
36. Van Velthoven CT, Heijnen CJ, Van Bel F, Kavelaars A. Osteopontin enhances endogenous repair after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke.* 2011; 42(8): 2.294-2.301.
37. Ge X, Lu Y, Leung TM, Sørensen ES, Nieto N. Milk osteopontin, a nutritional approach to prevent alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013; 304(10): 929G-939G.
38. West CE, Kvistgaard AS, Peerson JM, Donovan SM, Peng YM, Lönnerdal B. Effects of osteopontin-enriched formula on lymphocyte subsets in the first 6 months of life: a randomized controlled trial. *Pediatr Res.* 2017; 82(1): 63-71.
39. Lönnerdal B, Kvistgaard AS, Peerson JM, Donovan SM, Peng YM. Growth, nutrition, and cytokine response of breast-fed infants and infants fed formula with added bovine osteopontin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016; 62(4): 650-657.
40. Koletzko B, Beyer J, Brands B, Demmelmair H, Grote V, Haile G, et al. European Childhood Obesity Trial Study Group. Early influences of nutrition on postnatal growth. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2013; 71: 11-27.
41. Kvistgaard AS, Matulka RA, Dolan LC, Ramanujam KS. Pre-clinical in vitro and in vivo safety evaluation of bovine whey derived osteopontin, Lacprodan® OPN-10. *Food Chem Toxicol.* 2014; 73: 59-70.
42. Donovan SM, Monaco MH, Drnevich J, Kvistgaard AS, Hernell O, Lönnerdal B. Bovine osteopontin modifies the intestinal transcriptome of formula-fed infant rhesus monkeys to be more similar to those that were breastfed. *J Nutr.* 2014; 144(12): 1.910-1.919.