



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA**

**“El efecto de la administración oral de la lactoferrina  
bovina en los niveles de anticuerpos en suero y  
poblaciones de linfocitos T y B en bazo de ratón”**

**T E S I S**

**Para obtener el título de  
Licenciada en enfermería**

**PRESENTA:**

**Angélica López Flores**

**Directora de tesis  
Dra. María Maricela Carrasco Yépez**

**Los Reyes Iztacala, Edo.  
México 2019**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

---

## Agradecimientos

*Durante toda mi vida he cruzado con diferentes personas y eventos, que han ido forjando mi personalidad y que me han hecho reflexionar constantemente en lo que quiero lograr y sería muy complejo mencionar a todo ese número de personas.*

*Principalmente sería a **mis padres**, que siempre estuvieron dando todo lo que tenían para forjar una persona de bien en mí, en especial **mi madre** que siempre estuvo apoyándome hasta el último momento. **Mis hermanos**, que a pesar de todo siempre nos hemos mantenido unidos. **Mis amigos**, que siempre han creído en mí hasta cuando yo misma dudo de lo que puedo lograr, siempre son el impulso para seguir adelante, en especial a **Patricia, Laura, Frida, Elizabeth, Jazmín, Esther, Minea, Carlos y Alexis**, que siempre me dan inspiración, fuerzas, risas y buenas pláticas para seguir adelante. A **Jonathan**, que a pesar de todo siempre ha estado ayudándome, escuchándome y que sin él no habría llegado hasta aquí.*

*A **mis profesores**, que siempre vieron un gran potencial en mí e inculcaron el pensamiento crítico en todo lo que hago de mi vida.*

*A los doctores **Aldo e Ivonne y al laboratorio de inmunidad de mucosas**, que sin su paciencia y ayuda, este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo, que me acogieron y me brindaron su amistad.*

*A la Doctora **Maricela**, por darme esta gran oportunidad de emprender en la investigación básica.*

*Y a la vida misma...*

---

---

## Dedicatoria

*Al amor, ese sentimiento tan complejo que siempre ha inspirado las más grandes acciones, obras, pensamientos y sueños en las personas. Ese sentimiento que siempre me impulso a seguir con mis sueños y poder llegar a ser alguien para una persona.*

*Este trabajo, junto con muchos más son fruto del amor...*

---

---

## Prologo: Enfermería en la ciencia básica

La ciencia básica es aquella que nos proporciona información que nos hace conocer mejor un fenómeno, pero no tiene una aplicación inmediata, es el sustento del conocimiento y que da pie a la aplicación del conocimiento generado (1).

La investigación en enfermería viene fundamentada desde el surgimiento de esta como profesión, siendo Florence Nightingale, la primera enfermera teórica, la cual comenzó a formularse preguntas sobre ¿cómo mejorar los cuidados de los soldados que tenía bajo su cuidado? Nightingale supo conjugar los conocimientos que había adquirido para enfocarlos en la mejora del cuidado del paciente, conformando la primera teoría de enfermería, la cual fungió como cimiento de la profesión. Es así como enfermería se vuelve un eje el cual debe estar rodeado de las diferentes áreas de conocimiento, que fundamenta cada una de las acciones que realiza las enfermeras, enfocadas en la mejora del cuidado de la persona, volviéndose una profesión que fusiona los conocimientos y la práctica clínica que converge en el cuidado del paciente.

En la actualidad, la generación de conocimientos para el fundamento de la profesión, no solo puede venir de las ciencias básicas y sociales, si no que enfermería se ha convertido en la generadora del saber, no solo como para la fundamentación de cada una de las actividades, si no para las diferentes áreas, ya que se encarga del cuidado de todas las esferas que conforman a la persona. Y a pesar de ser acciones básicas, algunas sin dificultad u otras con mayor nivel de complejidad, la importancia de la fundamentación por medio de evidencia científica es importante, ya que la realización de dichas acciones se verá reflejado en la salud y en el cuidado de nuestro paciente.

La generación del conocimiento científico por parte del personal de enfermería es esencial, para la constante mejora de actividades de cuidado del paciente y la necesidad de responder las dudas que se generan en la profesión, hace que la investigación sea clave fundamental para el avance y brinda respuestas a las dudas que se generan, se ha pasado de la investigación en enfermería a la investigación del cuidado (2).

---

---

La importancia de la realización de investigación básica en enfermería, ayuda a ampliar el panorama sobre diferentes formas para la mejora del cuidado de la persona, incrementa y genera mayor conocimiento que puede ser aplicado para la realización de nuevas teorías, intervenciones de enfermería, que pueden dirigir al profesional hacia creación de nuevas técnicas, tratamientos y terapéuticas enfocadas hacia la mejora de la calidad de vida del paciente, su atención y cuidado de las necesidades que ellos no pueden suplir.

Además, enfermería puede dar un enfoque diferente a la investigación básica, debido al contacto directo que se tiene con el paciente, el brindado del cuidado y confort además de suplir las necesidades que no pueda suplir el paciente. Es por eso que el rol de investigador en enfermería es fundamental, ya que contantemente se debe de estar cuestionando, generando y actualizando el conocimiento que es la base importante para llevar acabo el cuidado del paciente. El personal de enfermería que desarrolle las habilidades en la investigación experimental, puede lograr la fundamentación de varias de las actividades que surgen de las preguntas diarias y que a su vez son generadoras de conocimiento, que contribuye en diferentes áreas de aplicación (3). El personal de enfermería con estas habilidades, no solo se convierte en generador del conocimiento si no se vuelve un puente con el investigador básico y el investigador clínico, que muchas veces, tienen una colaboración que se ve truncada por una falta de comunicación de entre las dos partes, impidiendo la obtención de resultados.

Desde mi ingreso a la carrera entre con una visión hacia la investigación y la licenciatura en enfermería, brinda una gran gama de posibilidades de desarrollarse en el ambiente profesional y sobre todo la oportunidad de profundizar conocimientos. El poder realizar investigación básica fue una gran oportunidad que se me presento, y este trabajo es muestra de eso, ya que refleja el aprendizaje, la profundización y la aplicación de los conocimientos que adquirí en el camino de mi formación profesional y en una opinión personal significa el gran potencial que tiene el personal de enfermería de poder llegar a espacios donde antes se podría decir que era difícil de alcanzar.

Esta tesis es fruto del periodo de servicio social, donde se me permitió trabajar en el laboratorio de Inmunidad de Mucosas, en la Escuela Superior de Medicina-IPN, en donde

---

---

encontré un ambiente muy distinto, que fue el área experimental, en donde enfermería no tiene mucha experiencia. Pero demuestra el potencial que tiene cada colega en la noble profesión.

---

---

## Resumen

En los últimos años, el uso de antibióticos ha disminuido su efectividad dificultando el tratamiento de la sepsis. Actualmente se buscan estrategias que optimicen la respuesta inmunológica. La lactoferrina es un candidato ideal debido a sus funciones terapéuticas y se ha comenzado los ensayos clínicos en pacientes posquirúrgicos y con sepsis para mejorar su pronóstico de vida. El presente trabajo pretende evaluar el efecto de la lactoferrina sobre las poblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y linfocitos B, así como la producción de anticuerpo IgM e IgG. Se usaron ratones de la cepa BALB/c y se formaron 8 grupos de 3 ratones cada uno. Se sacrificaron a los 3,5,7,9,11,13 y 15 días obteniendo el suero para medir IgM e IgG por ELISA y se obtuvieron linfocitos del bazo para medir el porcentaje de linfocitos T y B por citometría de flujo. Los resultados demuestran una disminución de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en el quinto día posterior a la administración de Lf. El mayor porcentaje de TCD3+ (20.37%), TCD4+ (14.10%) y TCD8+ (5.57), en contraste el porcentaje de linfocitos B disminuye al día 15 (7.14%). Al analizar los niveles de anticuerpos encontramos que al día cinco la IgM disminuye y aumenta al día trece y la IgG disminuye de manera significativa al día 5, 7 y 13. Como conclusión, es que el efecto de la lactoferrina sobre las poblaciones de linfocitos, no se da de una manera creciente proporcional a los días de administración de la bLf, sino que se observan aumentos y decrementos, formando oleadas de la expresión de estas poblaciones. Además de que la generación de la respuesta humoral, comienza a darse a partir del día 7, posiblemente a la generación de los complejos inmunes que limitan la absorción de la bLf. Existe una mayor producción de IgM, siendo esta una de las principales inmunoglobulinas que actúa en la activación de los mecanismos de la respuesta innata. En un escenario clínico, esto explicaría, que en los ensayos que se han llevado a cabo los neonatos pretérmino o de muy bajo peso, disminuye la incidencia de enterocolitis necrosante, sepsis neonatal. Ya que puede a acelerar el desarrollo de la respuesta adaptativa. Sin embargo, en el adulto, aún se requieren más estudios básicos sobre el efecto que pueda tener la lactoferrina.



---

---

## Abstract

In recent years, the use of antibiotics has decreased its effectiveness, making it difficult to treat sepsis. Currently, strategies are sought that optimize the immune response. Lactoferrin is an ideal candidate due to its therapeutic functions and clinical trials have begun in post-surgical patients with sepsis to improve their prognosis for life. The present work aims to evaluate the effect of lactoferrin on the populations of TCD3 +, TCD4 +, TCD8 + and B lymphocytes, as well as the production of IgM and IgG antibodies. BALB/c Mice were used, 8 groups of 3 mice each were formed. They were sacrificed at 3,5,7,9,11,13 and 15 days to obtain serum to measure IgM and IgG by ELISA and spleen lymphocytes were obtained to measure the percentage of T and B lymphocytes by flow cytometry. The results demonstrate a decrease in TCD3+, TCD4+ and TCD8+ lymphocytes on the fifth day after the administration of Lf. The highest percentage of TCD3 + (20.37%), TCD4 + (14.10%) and TCD8 + (5.57), in contrast the percentage of B lymphocytes decreases at day 15 (7.14%). When analyzing antibody levels we found that at day five the IgM decreases and increases at day thirteen and the IgG decreases significantly at day 5, 7 and 13. In conclusion, it is that the effect of lactoferrin on lymphocyte populations, it does not occur in an increasing manner proportional to the days of administration of the bovine lactoferrin, but increases and decreases are observed, forming waves of the expression of these populations. In addition to the generation of the humoral response, it begins to occur from day 7, possibly to the generation of immune complexes that limit the absorption of bovine lactoferrin. There is a greater production of IgM, this being one of the main immunoglobulins that acts in the activation of the mechanisms of the innate response. In a clinical scenario, this would explain that in the trials that have been carried out preterm or very low weight infants, the incidence of necrotizing enterocolitis, neonatal sepsis, decreases. Since it can accelerate the development of the adaptive response. However, in adults, more basic studies are still needed on the effect that lactoferrin may have.

# Índice de contenido

<i>Agradecimientos</i> .....	1
Dedicatoria.....	2
<b>Prologo: Enfermería la ciencia básica</b> .....	3
Resumen .....	6
Abstract.....	7
Índice de contenido.....	8
Índice de Figuras .....	10
Índice de tablas.....	10
Abreviaturas.....	11
1 Introducción .....	12
2 Marco teórico .....	13
2.1 Generalidades de la lactoferrina .....	13
2.2 Respuesta inmune.....	19
2.2.1 Células, tejidos y órganos del sistema inmune .....	19
2.2.2 Inmunidad Innata .....	23
2.2.3 Inmunidad adaptativa .....	26
2.2.4 Respuesta celular .....	27
2.2.5 Respuesta Humoral .....	33
2.3 Resistencia antimicrobiana, Sepsis e inmunidad .....	35
3 Antecedentes directos.....	43
3.1 Lactoferrina como inmunomodulador.....	43
3.2 Planteamiento del problema .....	46
3.3 Justificación .....	48
3.4 Hipótesis.....	49
3.5 Objetivo General.....	49
3.6 Objetivos específicos.....	49
4 Metodología.....	49
4.1 Diseño de la investigación .....	49
4.2 Validación del instrumento.....	49
4.3 Animales.....	50
4.4 Lactoferrina Bovina.....	50
4.5 Diseño experimental .....	50
4.6 Obtención de suero .....	51

---

---

4.7 Obtención de linfocitos a partir de bazo .....	51
4.8 Tinción de células para citometría .....	51
4.9 ELISA .....	52
4.10 Análisis estadístico .....	53
5 Resultados .....	54
5.1 Efecto de la bLf en la maduración de linfocitos T .....	54
5.2 Efecto de la bLf en el aumento de linfocitos B .....	56
5.3 EL efecto de la bLf sobre la producción de IgM e IgG .....	57
6 Discusión .....	59
7 Conclusiones .....	63
8 Perspectivas .....	64
9 Bibliografía .....	64

## Índice de Figuras

Fig.1 Estructura de la lactoferrina bovina .....	13
Fig.2 Sitios de unión de la lactoferrina humana.....	14
Fig.3 Ejemplos de glicosilaciones únicas en la lactoferrina humana, bovina y de cabra	15
Fig.4 Modelo de modulación de la inflamación y respuesta inmune celular .....	17
Fig.5 Organización de las células de origen mieloide .....	19
Fig.6 Organización de las células de origen linfoide .....	21
Fig.7 Morfología de un ganglio linfático .....	23
Fig.8 Fases de la respuesta inmune .....	25
Fig.9 Componentes del complejo TCR .....	28
Fig.10 Diferenciación de subtipos de linfocitos T CD4.....	29
Fig.11 Subgrupo de Th1 y el eje IL12-IFN $\gamma$ .....	30
Fig.12 Subgrupo Th2 .....	32
Fig.13 El linfocito B y sus diferentes actividades .....	34
Fig.14 Porcentaje de linfocitos T .....	55
Fig.15 Porcentaje de linfocitos B220+ .....	56
Fig.16 Producción de IgM y IgG total .....	58

## Índice de tablas

Tabla 1 Aplicaciones de la lactoferrina en investigación básica .....	18
Tabla 2 Características de los miembros de las células mieloides .....	20
Tabla 3 Características de las células de origen linfoide .....	21
Tabla 4 Escala de evaluación de fallo orgánico secuencial.....	38

---

---

## Abreviaturas

<b>Lf</b>	<b>Lactoferrina</b>
<b>bLf</b>	<b>Lactoferrina Bovina</b>
<b>Lfc</b>	<b>Lactoferricina</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolisacáridos</b>
<b>PG's</b>	<b>Proteoglicanos</b>
<b>LRP</b>	<b>Lipoproteínas de baja densidad</b>
<b>APC</b>	<b>Célula presentadora de antígeno</b>
<b>PAMP's</b>	<b>Patrones moleculares asociados a microorganismos</b>
<b>MHC</b>	<b>complejo mayor de histocompatibilidad</b>
<b>TCR</b>	<b>Receptor de linfocito T</b>
<b>ITAM</b>	<b>Activación tirosinica del receptor inmunitario</b>
<b>BCR</b>	<b>Receptor de linfocito B</b>

---

---

# 1 Introducción

El sistema inmune ha sido uno de los mecanismos de defensa que varias de las especies han desarrollado para defenderse ante agentes ajenos a ellos. En el caso de los seres humanos, el estudio de los mecanismos que forman parte de esta respuesta, ha permitido la mejora de las terapias para combatir las enfermedades infecciosas, que, en tiempos antiguos, eran mortales.

En la actualidad el estudio de la inmunología, se ha ido enfocado a seguir entendiendo elementos que forman parte de la respuesta inmune y los mecanismos moleculares por los que son activados, además de distintas formas para optimizar esta respuesta contra microorganismos, que han ido evolucionando, fortaleciéndose y cambiando sus mecanismos de invasión y virulencia. Una forma de con la que se busca llevar a cabo todas estas acciones es con el uso de sustancias inmunomoduladoras.

Un inmunomodulador es aquella sustancia que interactúa con los elementos del sistema inmune, haciendo que estos disminuyan, aumenten o se mantengan estables(4) y se clasifican como supresores, estimuladores y de restauración. Muchos de estos ya son usados en la práctica clínica, para estimular o normalizar la actividad inmunológica de los pacientes. Pueden ir desde medicamentos como los corticoides y el metotrexate, hasta otras alternativas como algunos elementos de la dieta como es el caso de los flavonoides o la lactoferrina (4)(5).

En los últimos años, el uso indiscriminado de la terapia antibiótica, ha disminuido su efectividad contra muchos de los microorganismos, es por eso que se buscan compuestos que puedan ayudar al fortalecimiento del sistema inmune para así poder hacer frente a los microorganismos patógenos, sin causar efectos secundarios. En el caso de una terapia intensiva, una de las complicaciones con una alta tasa de mortalidad es la sepsis, siendo esta una respuesta descontrolada del sistema inmune ante la invasión de un agente infeccioso.

La lactoferrina, es una glicoproteína producida por la mayoría de los mamíferos y puede ser encontrada en diferentes secreciones, volviéndola inofensiva para su uso. Se han demostrado diferentes efectos fisiológicos que son benéficos para la salud. En el presente trabajo, se analiza el efecto de la lactoferrina (Lf) en las poblaciones linfocitarias y producción de anticuerpos en ratones BALB/c sanos tratados con lactoferrina bovina (bLf).

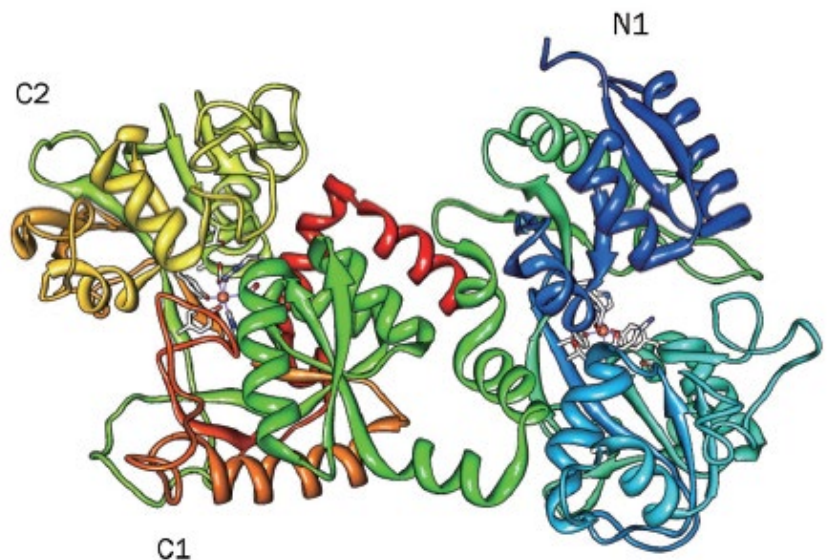
## 2 Marco teórico

### 2.1 Generalidades de la lactoferrina

La lactoferrina (Lf) es una Glicoproteína, monomérica no hemática, producida por los mamíferos, que se encuentra distribuida en diferentes fluidos, leche, calostro, saliva, lagrimas, bilis, secreciones vaginales, semen, fluido bronquial y en gránulos secundarios de neutrófilos(6) (7).

Pertenece a la familia de las transferrinas, de unión a hierro de 80

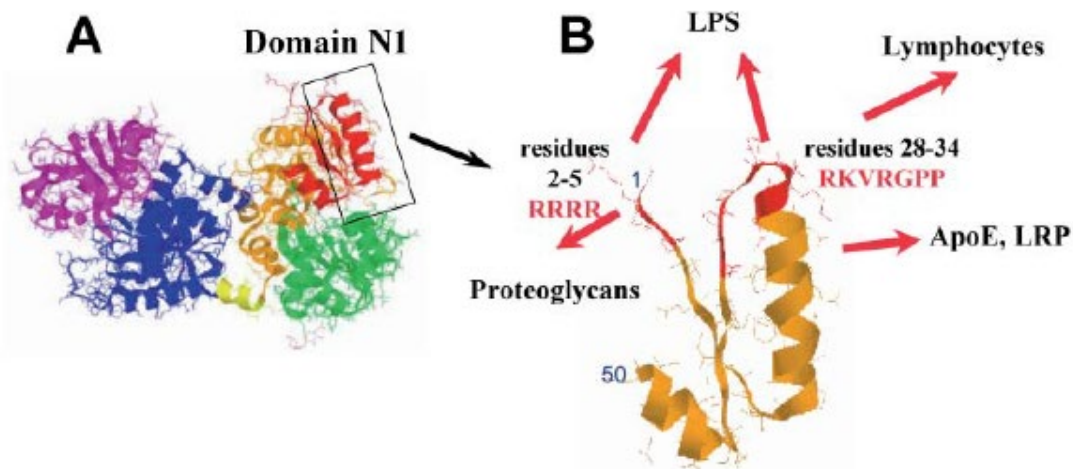
kDa, con 690 a 700 secuencias de aminoácidos, que son homologas casi en el 100% de la de las distintas especies mamíferas; dependiendo del tipo de lactoferrina, la cantidad de aminoácidos varia, así como su estructura, esta estructura consta de dos lóbulos, N y C, los cuales están unidos por cadena corta de alfa hélice (región bisagra). Los lóbulos se organizan en dos dominios globulares N1-N2, C1-C2 (**Figura 1**), siendo en su dominio N1 donde se encuentra la mayor parte de su carga catiónica, llamado dominio de lactoferricina (Lfc), que le brinda la mayor parte de las funciones a la lactoferrina. La Lfc es un residuo que resulta de la digestión tanto de la lactoferrina humana (hLf) y de lactoferrina bovina (bLf), sus residuos básicos han demostrado ser la parte responsable



*Figura 1 Estructura de la lactoferrina bovina. Extraído de Siqueiros-Cerdón et al 2014*

de todas las actividades independientes que ejerce la lactoferrina en las célula (**Figura 2**). La naturaleza cationica de la lactoferrina, permite que se adhieran a la superficie de diferentes células, esto es debido a sus proteoglicanos que contienen los sitios de unión de la Lf, principalmente dos residuos de la proteína, RRRR y RKVR, son los sitios cationicos que se unen con las cadenas sulfatadas (8)(9).

La diferencia entre las lactoferrinas de distintas especies radica en las glicosilaciones que contiene la proteína, se ha visto que tanto la lactoferrina humana, de vaca y de cabra tiene 13 glicosilaciones en común, compuestas principalmente de manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, fucosa y ácido siálico, tanto la lactoferrina bovina y la de cabra presentan ácido N-glicolilneuramínico, pero esta última no se encuentra en la lactoferrina humana, se ha teorizado que las glicosilaciones determinan la función biológica que va a tener la lactoferrina, sin embargo esto aún no se ha comprobado (10). (**Figura 3**)



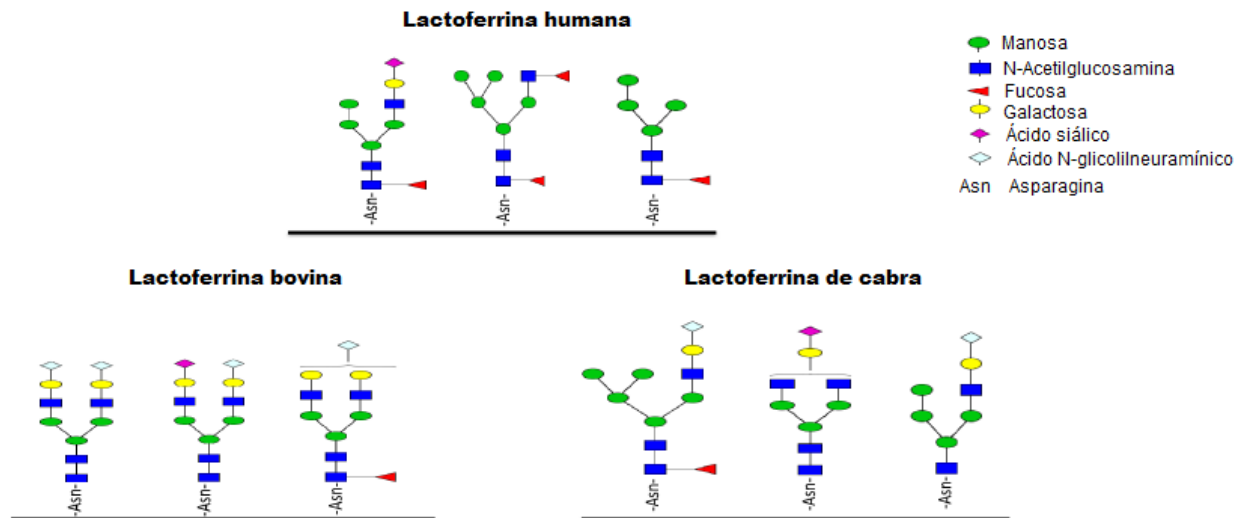
**Figura 2** Sitios de unión de la lactoferrina humana. Extraído de Legrand, 2005.

Existen varias funciones biológicas que ha mostrado la lactoferrina:

Su capacidad bacteriostática, que disminuye la proliferación bacteriana debido a su capacidad de captar  $Fe^{3+}$ , este es importante para el crecimiento de los agentes patógenos. Su actividad bactericida, derivada de la capacidad de la Lactoferrina de interactuar con los cationes bivalentes, estos cationes le brindan estabilidad a la superficie bacteriana y a los componentes bacterianos con carga negativa, como lo son los lipopolisacáridos (LPS), todo esto resulta en la desorganización y desestabilización de la



superficie celular, provocando pérdida de la permeabilidad y finalmente la muerte de microorganismo.(8)



**Figura 3.** Ejemplos de glicosilaciones únicas en la lactoferrina humana, bovina y de cabra  
Extraído de Karav, 2017.

La unión de la lactoferrina a los sitios sulfatados de las células ha demostrado que es un mecanismo importante para activar diferentes vías de señalización modulando la **producción de diferentes citocinas**, que van dirigidas a la disminución de la respuesta inflamatoria (9), además de que esta glicoproteína ha demostrado tener **efectos inmunomoduladores**. La unión de la lactoferrina con distintos receptores ayuda a la **endocitosis de la glicoproteína desencadenando diferentes vías de señalización**, el principal receptor que se encuentra en epitelio intestinal es la **interlectina**, que interviene en la endocitosis de la lactoferrina para que se dirigirá al núcleo. Se ha identificado además otros receptores como lo son los **proteoglicanos (PG's)**, que son de baja afinidad pero se unen a la lactoferrina y se encuentran distribuidos en una gran cantidad de células, también se encuentra el **receptor de nucleolina**, encontrado en linfocitos, plaquetas y células mamarias, y el receptor de **lipoproteínas de baja densidad (LRP)** que se une a la lactoferrina desencadenando los efectos inmunomoduladores (11).

En la **figura 4** se puede observar el mecanismo con el que la lactoferrina ejerce su acción antiinflamatoria e inmunomoduladora al ser administrada por vía oral, entra la lactoferrina y

---

---

es absorbida a nivel intestinal para así después llegara a la sangre y **distribuirse a órganos sistémicos**. Ya distribuida, la lactoferrina se une al receptor CD14, **impidiendo la unión con los LPS** bacterianos y al mismo tiempo **su unión con el TLR-4 se bloquea**. Debido a esto no existe la interacción de LPS-TLR4, impidiendo la **producción de factores de transcripción que ayudan a expresión de mediadores pro-inflamatorios**. Los PG facilitan la unión de la lactoferrina con los receptores nucleolina y LRP. La unión de la lactoferrina con los LPRs ayuda a su internalización activando vias de señalización intracelulares. A su vez, al unirse la lactoferrina con la nucleolina favorece la endocitosis e interacción nuclear.

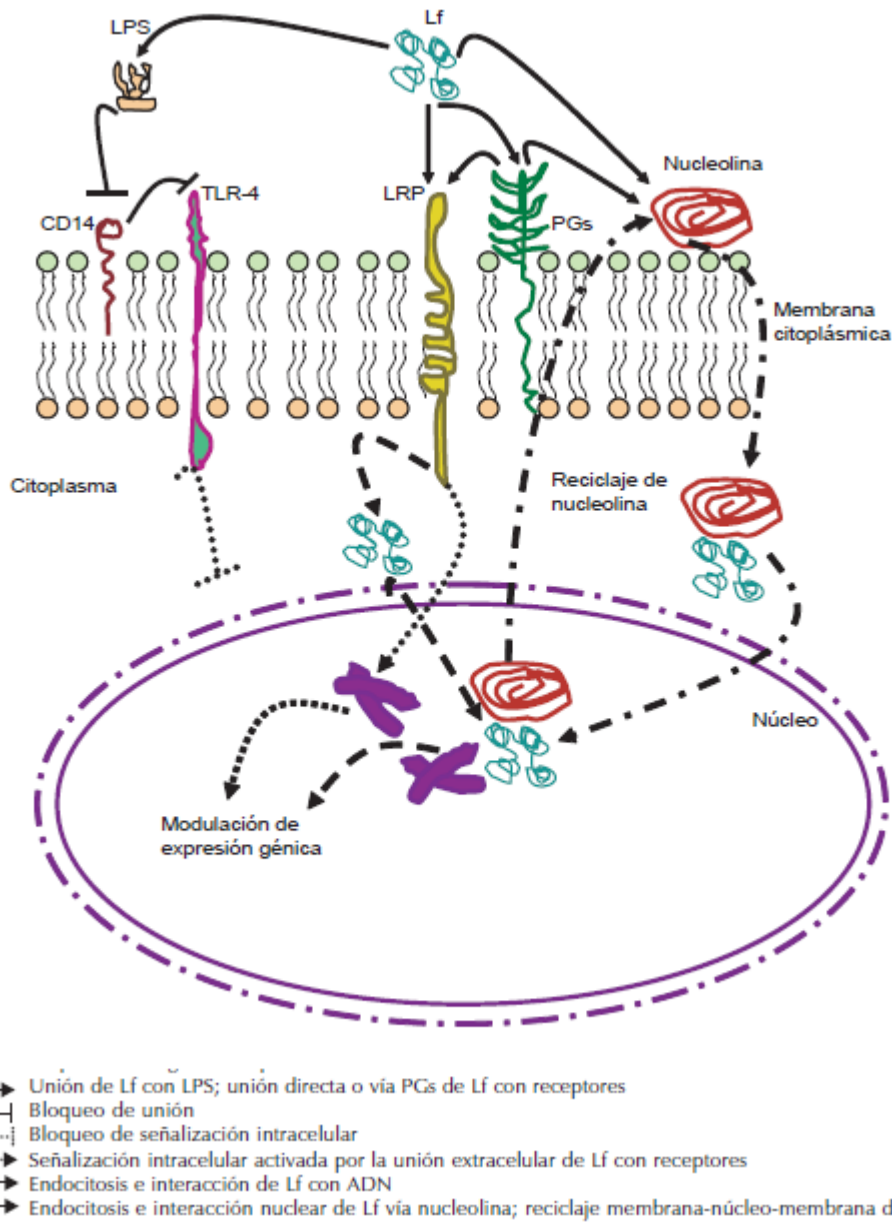


Figura 4 Modelo de modulación de la inflamación y respuesta inmune celular de lactoferrina a través de su interacción con receptores. Extraído de Drago-Serrano, 2008.

aun no se tiene claro cuáles son los mecanismos moleculares que desencadenan su actividad inmunomoduladora, se cree que la Lf, al mismo tiempo, tiene una gran influencia en la maduración de la inmunidad adaptativa, al acelerar la maduración de las células precursoras en linfocitos T maduros además de la diferenciación de linfocitos B inmaduros para ser ideales en la presentación de antígenos.

Debido a esto la Lf se ha convertido en una glicoproteína que contiene una gran cantidad de funciones (**Tabla 1**) que se puede aplicar en escenarios clínicos, en el presente trabajo se enfocará más en su función inmunomoduladora sobre las poblaciones de linfocitos T y B, a continuación, se describirá los elementos de la respuesta inmune.

Aplicaciones de la lactoferrina en investigación básica	
Actividad	Descripción
Actividad antimicrobiana	Debido a su capacidad de captar Fe <sup>3+</sup> , se ha probado contra diferentes microorganismos y ha demostrado ser eficaz en la reducción de microorganismo Gram positivos, Gram negativos y acido-alcohol resistentes (12).
Actividad antifúngica	La lactoferrina demostró ser eficaz al eliminar la candidiasis provocada por <i>Candida albicans</i> en ratones administrados por vía oral (13).
Actividad antivírica	Se ha visto en varios estudios <i>in vitro</i> que la lactoferrina tiene un efecto inhibitorio contra varios RNA y DNA virus (14).
Actividad antiparasitaria	Se ha probado en estudios <i>in vitro</i> , contra trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> (15), <i>Toxoplasma gondii</i> (16) y <i>Babesia caballi</i> (17) inhibiendo su crecimiento.
Actividad anticancerígena	Debido a su habilidad inmunomoduladora, la lactoferrina regula la producción de citocinas en el cáncer, además de que induce apoptosis y disminuye el crecimiento de tumores. En un estudio de carcinoma en colon implantado en ratón, se administró bLf que inhibió el crecimiento de los tumores (18). En otro estudio también en ratón, la administración oral de lactoferrina inhibió el crecimiento de carcinoma de cuello y cabeza (19).
Prevención de lesiones en el tejido pulmonar	En un modelo de lesión por hiperoxia en ratón, se administró la lactoferrina por nebulizaciones, se encontró que la Lactoferrina tiene un efecto protector y antiinflamatorio en las lesiones provocadas por hiperoxia, además de que reduce las lesiones crónicas en el pulmón(20).

Tabla 1: Aplicaciones de la lactoferrina en investigación básica

## 2.2 Respuesta inmune

En el ambiente, los seres vivos están en constante contacto con agentes ajenos a ellos mismos, un ejemplo claro lo podemos ver en el ser humano, que constantemente están en contacto con millones de microorganismos que pueden causarle enfermedad o incluso la muerte. A pesar de eso, los distintos organismos han logrado desarrollar un sistema que está conformado por sustancias químicas y células, que se encarga de defender del posible daño de agentes ajenos a ellos, a este lo conocemos como sistema inmunitario, siendo la respuesta inmune, la acción que ejercen estos elementos, al enfrentarse a sustancias ajenas o algún elemento propio del organismo que le provoque algún daño (21). Como cualquier sistema, podemos encontrar tejidos y órganos que se encargan de la generación, mantenimiento y circulación de las células que tiene como principal función la protección del cuerpo, en el siguiente apartado se describirá los componentes de este sistema.

### 2.2.1 Células, tejidos y órganos del sistema inmune

Los principales elementos del sistema inmune lo constituyen las células inmunitarias, ellas se encargan de estar en constante circulación para así proteger el cuerpo del hospedero de cualquier ataque o daño que se presente. Todas estas células provienen de una célula troncal hematopoyética, que posteriormente dan origen a células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides (Figura 5).

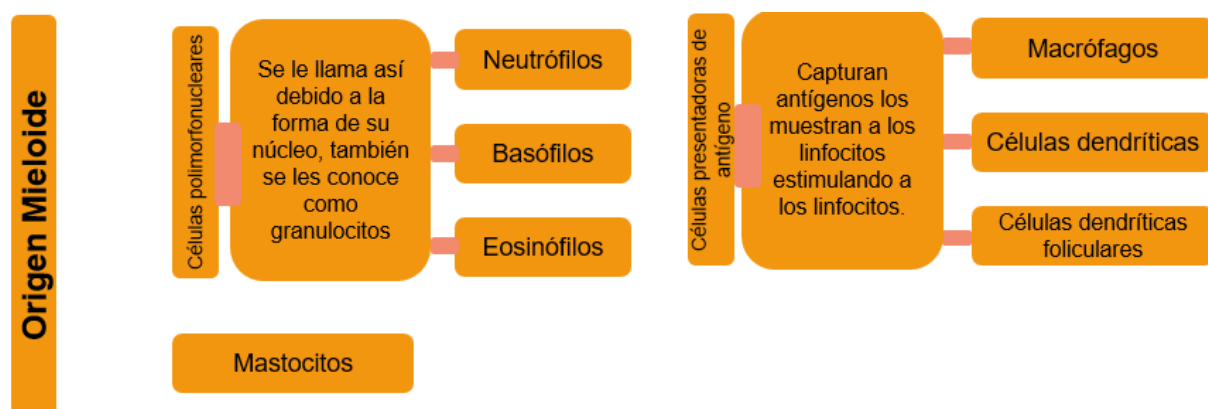


Figura 5: Organización de las células de origen mieloide

Entre las células de origen mieloide encontramos a las células polimorfonucleares que están conformadas por los neutrófilos, basófilos y eosinófilos; las células presentadoras de antígenos (APC), en las cuales encontramos a los macrófagos, células dendríticas y células dendríticas foliculares y a los mastocitos. A su vez los neutrófilos, basófilos, eosinófilos y macrófagos constituyen a las células fagocíticas, células que se encargan de capturar al microorganismo en su interior y eliminarlos (fagocitosis) (21)(22). En la **tabla 2** se resumen las características de cada una de las células.







Células de origen mieloide				
	Tipo de célula	Características	Se producen en:	Función
Células presentadoras de antígeno	<b>Macrófago</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asumen fenotipos especializados dependiendo del órgano</li> <li>• Al Salir de médula ósea como monocitos entran a la circulación, emigran a los tejidos sobre todo en reacciones inflamatorias y ahí se convierten en macrófagos</li> <li>• Reconocer muchos tipos diferentes de moléculas microbicidas</li> <li>• Adquieren capacidades funcionales especiales, dependiendo de los tipos de estímulos activadores a los que se exponen.</li> </ul>	médula ósea, la línea macrófágica es dirigida por una proteína llamada factor estimulante de colonias de monocitos (o macrófagos) (M-CSF).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ingerir y matar microbios y células muertas o con lesión</li> <li>• Secretan citocinas en las células endoteliales para promover el reclutamiento de mas monocitos y leucocitos</li> <li>• Son células presentadoras de antígenos</li> <li>• Promueven la reparación del daño</li> </ul>
	<b>Célula dendrítica</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proyecciones membranas largas y capacidad fagocítica</li> <li>• Distribuidos en tejidos linfáticos, el epitelio mucoso y el parénquima de los órganos</li> <li>• Maduran por una citocina llamada ligando de Flt3</li> <li>• expresan receptores que reconocen moléculas producidas habitualmente por microbios</li> </ul>	Medula Ósea	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activan a los linfocitos T vírgenes</li> <li>• Clásicas: responden a los microbios emigrando a los ganglios linfáticos, donde presentan los antígenos proteínicos microbianos a los linfocitos T.</li> <li>• Plasmacitoides: Reconocen ácidos nucleicos de los virus intracelulares y producen interferones del tipo I (antiviral)</li> </ul>
Células polimorfonucleares (granulocitos)	<b>Mastocitos</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presentes en la piel y los epitelios mucosos, junto a lo vasos sanguíneos</li> <li>• Contienen abundantes gránulos citoplásmicos llenos de histamina y otros mediadores</li> <li>• expresan en la membrana receptores IgE</li> </ul>	médula ósea, la citocina factor de célula troncal (también llamada ligando de c-Kit) es esencial para el desarrollo del	Al entrar contacto con el antígeno, comienza la inducción de señales que liberan el contenido citoplasmático a espacio extracelular, promoviendo la inflamación
	<b>Neutrófilos</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células esféricas de 12 a 15 µm de diámetro con numerosas proyecciones membranas.</li> <li>• Su núcleo está segmentado en tres a cinco lóbulos conectados</li> <li>• Gránulos específicos, están llenos de enzimas como la lisozima, la colagenasa y la elastasa (no se tiñen tan intensamente)</li> <li>• Después de entrar al tejido, duran de 1 a 2 días y mueren</li> </ul>	Médula ósea, su producción se activa por el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pueden migrar a lugares de infección rápidamente tras la entrada de microbios</li> <li>• Fagocitan microbios y productos de células necróticas</li> <li>• Sus gránulos (azurófilos ) contienen sustancias antimicrobianas, defensinas y las catelicidinas</li> </ul>
	<b>Basófilos</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tienen similitudes estructurales y funcionales con los mastocitos</li> <li>• Constituyen menos de 1% de los leucocitos</li> </ul>	médula ósea	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pueden ser reclutados en algunas zonas inflamatorias</li> <li>• son capaces de sintetizar muchos de los mismos mediadores que los mastocitos</li> <li>• expresan receptores para la IgE, ligan IgE y pueden activarse por la unión del antígeno a la IgE</li> </ul>
	<b>Eosinófilos</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contienen proteínas básicas que ligan pigmentos ácidos como la eosina</li> <li>• Las citocinas GM-CSF, IL-3 e IL-5 promueven su maduración</li> </ul>	Medula Ósea	Expresan gránulos que contienen enzimas lesivas para las paredes celulares de los parásitos

Tabla 2: Características de los miembros de las células mieloides

Las células de origen linfoide (Figura 6) son los linfocitos B, podemos encontrar B2 o foliculares, que son lo que encontramos en la circulación y en centros germinales, constituyen la mayoría, los linfocitos B1, que se encuentran principalmente en peritoneo y son la minoría, y los de la zona marginal, que se encuentran solamente en el bazo. Los linfocitos T son constituidos por los CD4+ cooperadores, CD8+ Citotóxicos, Reguladoras, Linfocitos Natural Killer y linfocitos T $\gamma\delta$  que se encuentran principalmente en tejidos mucosos. (Tabla 3).

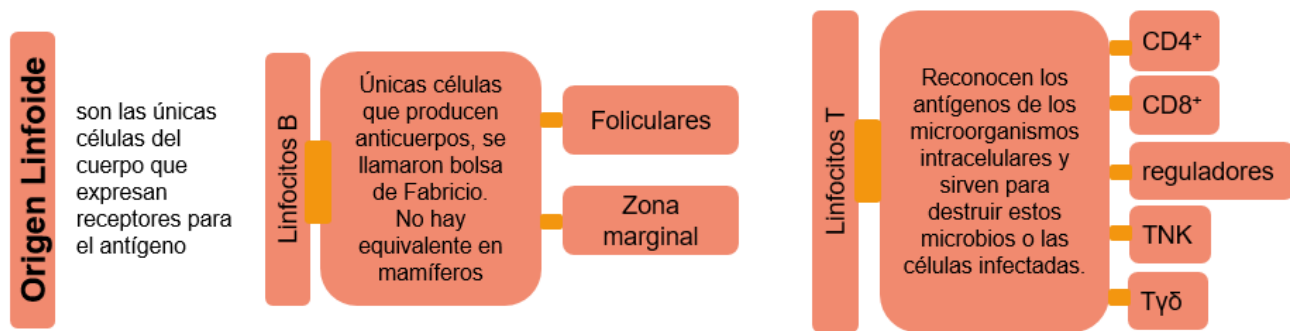


Figura 6: Organización de las células de origen linfoide

Células de origen Linfoide				
	Tipo de célula	Funciones	Receptor para el antígeno y especificidad	Selección de marcadores de fenotipo
Linfocitos B	Linfocitos B foliculares	Producción de anticuerpos (inmunidad humoral)	Anticuerpo de superficie Diversas especificidades frente a muchos tipos de moléculas	Receptores para el Fe, clase II del MHC, CD19+, CD23
	Linfocitos B de zona marginal	Producción de anticuerpos (inmunidad humoral)	Ig de superficie Especificidades frente a un grupo limitado de moléculas	IgM, CD27+
Linfocitos T	Linfocitos T CD4+ cooperadores	Diferenciación del linfocito B (inmunidad humoral) Activación del macrófago (inmunidad celular) Estimulación de la inflamación	Heterodímeros $\alpha\beta$ Especificidades diversas frente a complejos péptido-clase II del MHC	CD3+, CD4+, CD8-
	Linfocitos T CD8+ citotóxicos	Muerte de células infectadas por virus o bacterias intracelulares	Heterodímeros $\alpha\beta$ Especificidades diversas frente a complejos péptido-clase I del MHC	CD3+, CD4-, CD8+
	Linfocitos T CD4+ Reguladores	Suprimen la función de otros linfocitos T (regulación de respuestas inmunitarias, mantenimiento de tolerancia frente a lo propio)	Heterodímeros $\alpha\beta$ Específicos frente a antígenos propios y algunos extraños (complejos péptido-clase II del MHC)	CD3+, CD4+, CD25+ FoxP3+ (el más frecuente, pero también otros fenotipos)
	Linfocitos T NK	Suprime o activa respuestas inmunitarias innatas y adaptativas	Heterodímeros $\alpha\beta$ Especificidades limitadas frente a complejos glucolípido-CDI	CD56+, CD16+ (receptor para Fe de IgG), CD3+
	Linfocitos T $\gamma\delta$	Funciones cooperadora y citotóxica (inmunidad innata)	Heterodímeros $\gamma\beta$ Especificidades limitadas frente a antígenos peptídicos y no peptídicos	CD3+, CD4+ y CD8 variable

Tabla 3: Características de las células de origen linfoide



---

---

El desarrollo y maduración de los linfocitos T, a diferencia de los linfocitos B y de las células de origen mieloide, que maduran en la médula ósea, se lleva a cabo en el timo. Cuando salen del timo, estos linfocitos salen a circulación siendo vírgenes, sin haber entrado en contacto con un antígeno, posteriormente en el bazo o en los nódulos linfáticos se encuentran con su antígeno y maduran a linfocito CD4+, CD8 o regulador (21). Todos estos procesos de desarrollo, circulación y maduración se llevan a cabo en los tejidos y órganos linfoides. Los órganos linfoides los podemos dividir en: Órganos linfoides generadores o primarios y órganos linfoides periféricos o secundarios.

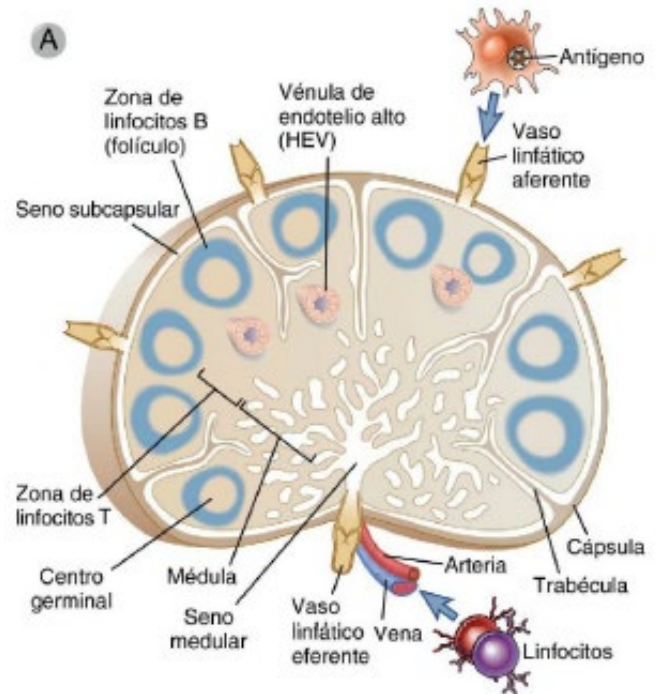
En los órganos linfoides primarios es donde se lleva a cabo la generación y maduración de las células inmunitarias y sanguíneas, el timo es el órgano donde los linfocitos T maduran para salir a circulación posteriormente, tiene una capsula fibrosa dividida en varios lóbulos angulares, cada uno conformado por una médula central clara, poblada de linfocitos T; rodeada por una corteza más oscura y densa. Todo esto sellado por células epiteliales de la médula y la rodean con vasos sanguíneos y grupos de linfocitos en la corteza, es así que se forma una barrera hematotímica, que aísla a los linfocitos en desarrollo de los antígenos portados en la sangre. La médula ósea, es otro de los órganos primarios, es el lugar de generación de la mayoría de las células sanguíneas circulantes maduras, incluidos los eritrocitos, los granulocitos y los monocitos. También es el lugar donde se presentan los primeros acontecimientos madurativos del linfocito B (23).

Los órganos linfoides secundarios son los ganglios linfáticos, el bazo, el sistema inmunitario cutáneo y el sistema inmunitario mucoso, es aquí donde se inicia la respuesta contra los antígenos que se encuentran circulando. El sistema linfático es una red de vasos que se encuentra distribuida por todo el cuerpo, que principalmente se encarga de drenar la linfa de los ganglios linfáticos y la sangre, todo esto a través de la red de capilares linfáticos.



El bazo es uno de los más grandes órganos linfoides, su parénquima muestra dos tipos de tejidos, pulpa roja, que consta de senos inundados de eritrocitos concentrados, siendo su principal función la eliminación de células sanguíneas viejas y dañadas, **además de ser un filtro importante para la sangre eliminando microbios, células dañada.**

La pulpa blanca constituida por linfocitos y macrófagos agregados a lo largo de pequeñas ramas de la arteria esplénica, su principal función es promover respuestas inmunitarias adaptativas en presencia de un antígeno que este en la circulación, estos llegan al seno marginal por medio de las células presentadoras de antígenos o son captados por macrófagos de esta zona, esta disposición promueve una respuesta eficiente. (21)(22) **(Figura 7)**



*Figura 7: Morfología de un ganglio linfático. Extraído de Abbas, 2009*

En la literatura médica y para su mayor comprensión, la respuesta inmune se divide en inmunidad innata, que se encargar de generar una respuesta inmediata a cualquier daño que sea provocado en el cuerpo, y la inmunidad adaptativa que es la repuesta iniciada por el estímulo de patógenos, volviéndola más específica hacia una gran cantidad de microorganismos, cada una de estas repuestas tiene distintas características la cuales se describirán a continuación.

### **2.2.2 Inmunidad Innata**

Debido al constante contacto con el exterior y con distintos agentes patógenos, el cuerpo debe de responder inmediatamente a cualquier ataque que pueda provocar un posible daño, de esta defensa se encarga el sistema inmune innato, su inicio es inmediato, ya que los elementos que la constituyen tienen una gran capacidad de acción.

---

---

El primero de estos elementos son las barreras físicas como la piel, los tejidos mucosos y epitelios, que son el primer obstáculo para la introducción de microorganismo y sustancias que pueden provocar daño, estas barreras conforman una muralla que es difícil penetrar por uniones entre cada una de las células que la conforman, llamadas uniones oclusivas y uniones estrechas (24) (21). Al mismo tiempo, podemos encontrar otros mecanismos físicos de estas barreras como son los movimientos ciliares, o la producción de una capa de moco que impide que las bacterias puedan unirse al epitelio, estos elementos van a ser característicos de las regiones anatómicas en donde se dé la respuesta.

Otra protección que podemos encontrar son las barreras químicas, junto con las físicas evitan la proliferación de los patógenos, de estas se pueden mencionar el pH y distintas enzimas que varían dependiendo del tejido, un ejemplo de ellas son la pepsina que se encuentra en el intestino o la lisozima que se encuentra en las lágrimas. Al romperse estas barreras, se ve comprometida la protección del individuo, comenzando la invasión de los microorganismos patógenos, ocurrido esto, el patógeno puede encontrarse con microbiota residente, la cual compite por nutrientes con los microorganismos invasores (22).

Por otra parte, se encuentran linfocitos, células de respuesta adaptativa, que reconocen de forma específica a ciertos microorganismos o pueden generar la producción de anticuerpos que neutralizan sustancias u opsonizan a los patógenos; a pesar de que estos elementos son parte de la respuesta adaptativa, su función reside en optimizar la respuesta innata, activando a las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas, y linfocitos citolíticos naturales (Natural Killers o NK).

Esta respuesta además de ser inmediata tiene la capacidad de reconocer gran cantidad de estructuras moleculares que son compartidas por la mayoría de los microorganismos, llamadas patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMP's). Estos patrones son reconocidos por receptores que se encuentran en las células de la respuesta inmune innata, que inician una cascada de señalización molecular, que termina en el núcleo y se transcriben sustancias de origen proteico, llamadas citocinas, la cuales se liberan al medio extracelular, dirigiendo y coordinando la respuesta para la eliminación de la infección (22).

A pesar de su alta rapidez de respuesta y su gran capacidad de reconocimiento de distintos microorganismos, la deficiencia de su especificidad impide que se elimine completamente la infección, además de que muchas veces la respuesta generada por la inmunidad innata puede provocar daños en el organismo (**Figura 8**). Es por eso, que al mismo tiempo que se genera la respuesta innata, las citocinas que se generan por las células, inicia la formación de la respuesta adaptativa, que además de ser mucho más específica va a regular la acción de las células de la inmunidad innata.

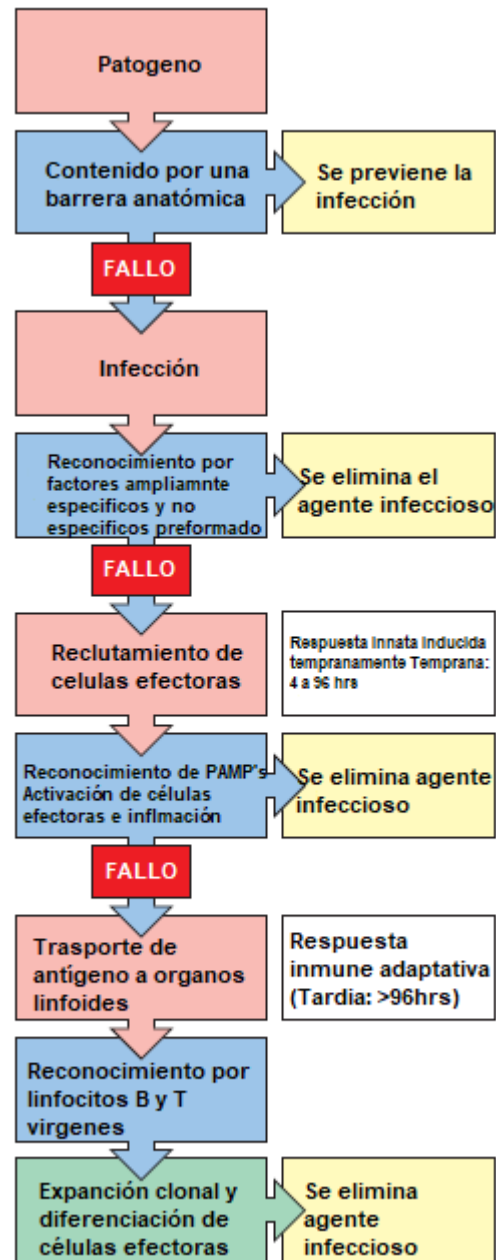


Figura 8: Fases de la respuesta inmune, modificado d Murphy, 2017

---

---

### 2.2.3 Inmunidad adaptativa

Como ya se había mencionado, la inmunidad adaptativa es aquella respuesta generada cuando un microorganismo patógeno invade el organismo y la inmunidad innata no puede contener la infección (22) . Esta repuesta reconoce una gran cantidad se sustancias microbianas y no microbianas que son reconocidas por los linfocitos, estas sustancias reciben el nombre de antígenos.

Debido a que se reconoce un antígeno específico del microorganismo, la **especificidad** de esta repuesta es mucho mayor, aunado a esto, esta respuesta no afecta a células propias del hospedero, otra ventaja es la **memoria** que se genera, lo que quiere decir que, al momento de que se vuelva a llevar acabo otro ataque contra este microorganismo, la repuesta será mucho más fuerte y se eliminara de manera más rápida(21).

La **especificidad** es mediada por células de la inmunidad innata, las cuales reciben el nombre de células presentadoras de antígenos (APC), en estas células se incluyen los macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Al iniciarse la respuesta innata, las células dendríticas están en contante monitoreo de las barreras epiteliales, estas células captan los antígenos de los microorganismos de una manera eficaz y los procesan dentro de ellas. A su vez, cuando el microorganismo ha pasado las barreras, los macrófagos se encargan de capturar al patógeno y lo procesan, ese proceso recibe el nombre de fagocitosis. Al procesar al patógeno, se obtiene el antígeno que posteriormente es presentado en la superficie de la APC, en forma de una secuencia de aminoácidos, montada en una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), este procesamiento de antígenos ayuda a que se puedan presentar una gran **diversidad** de antígenos para que sean identificados por los linfocitos T, estos linfocitos T y las respuestas que se activaran serán **especializadas** y muy fuertes contra el microorganismo que había sido presentado por el MHC.

El MHC se une al receptor de linfocito T (TCR), activándolo para ejercer una respuesta contra el organismo patógeno. Los linfocitos T solo pueden identificar antígenos de origen extraño, esto hace que los linfocitos no reaccionen contra antígenos propios del

---

---

hospedero, haciendo que la inmunidad adaptativa **no tenga reactividad contra lo propio del hospedero**. La molécula de MHC puede activar tanto a los linfocitos cooperadores CD4 y a los linfocitos citotóxicos CD8.

Como su nombre lo dice, los linfocitos citotóxicos, tiene como principal función eliminar por medio de un ataque químico a las células que han sido infectadas por microorganismos intracelulares. Otra población que se encuentran son los linfocitos T reguladores, ellos se encargan de **contener y mantener en homeostasis** las respuestas de los linfocitos CD4 y CD8, ya que una respuesta exagera o descontrolada puede generar daño en el organismo hospedero. Por último, se encuentran los linfocitos CD4 cooperadores, estos se encargan de dirigir los mecanismos de la repuesta innata y adaptativa por medio de la liberación de citocinas, al ser liberadas ejercen su acción para que los linfocitos T puedan proliferar, a esta acción se le llama **expansión clonal**, esta característica le ayuda al organismo hospedero a tener células específicas contra el microorganismo presentado, que se almacenan y responden a encuentros futuros contra el mismo agente infeccioso, generando **memoria**. Por otro lado, la liberación de citocinas ayudara a la maduración de los linfocitos B y activación de células como macrófagos y leucocitos. La acción de estas células es muy importante, la correcta activación y regulación de su actividad es esencial para obtener una respuesta optima y eficaz contra infecciones o agentes que pueden provocar daño al hospedero.

Debido a su capacidad de desarrollar una respuesta más fina al ataque contra las infecciones, el desarrollo de la repuesta adaptativa es más lenta. A diferencia de la velocidad de respuesta de la inmunidad innata, que puede comenzar en minutos u horas, la activación de la respuesta adaptativa es más tardada debido a todos los mecanismos que se efectúan. Toda esta parte de la respuesta adaptativa efectuada por los linfocitos T es conocida como respuesta celular, y es importante para la activación de otro componente de la inmunidad adaptativa, que es la respuesta humoral. A continuación, se describirán las características importantes de cada una de estas respuestas adaptativas.

#### *2.2.4 Respuesta celular*

Los linfocitos T son una parte esencial de la inmunidad adaptativa celular, sobre todo los linfocitos cooperadores CD4, ya que gracias a ellos se establecen los mecanismos efectores y de memoria. La **inmunidad celular** se refiere al proceso de lisis de los microbios mediado por los fagocitos y estimulado por los linfocitos T CD4 (21).

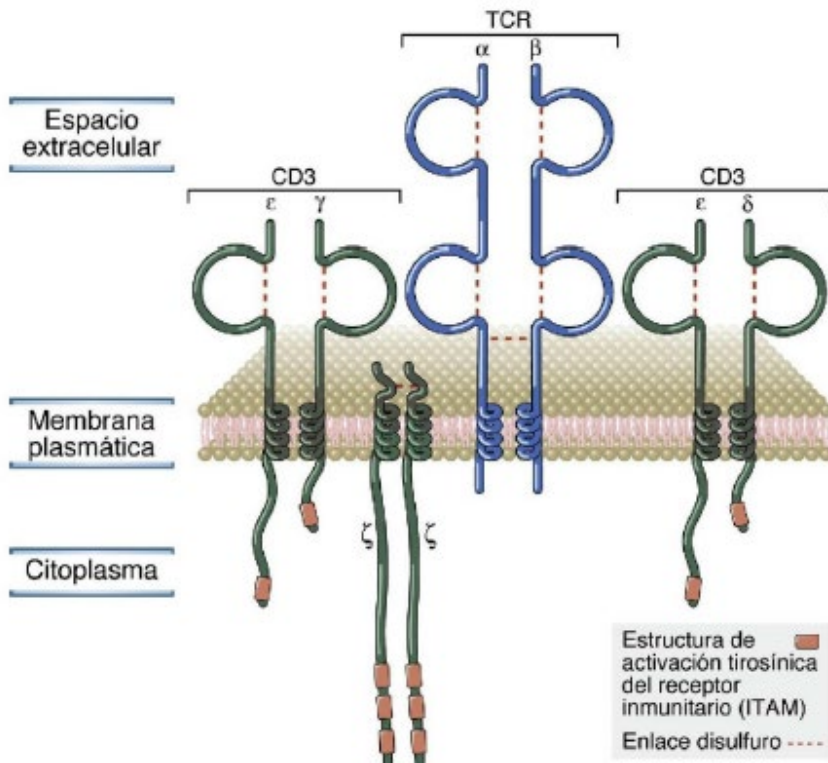


Figura 9: Componentes del complejo TCR. Abbas, 2009

9, tanto el receptor de CD4 y CD8 se encuentra conformado por un heterodímero de dos cadenas que atraviesa la membrana celular, cada una de las cadenas tiene el nombre de  $\alpha$  y  $\beta$ , es por eso que se le denomina linfocitos  $\alpha\beta$ , que son la gran mayoría de los linfocitos, en menor proporción se encuentran los linfocitos  $\gamma\delta$ , que contienen cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ , en lugar de la  $\alpha$  y  $\beta$ . Junto con estas dos cadenas del receptor, se encuentran las proteínas complemento CD3 y  $\zeta$ , estas proteínas junto con las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , forman el complejo TCR, si alguna de estas proteínas no está presente, la traducción de señales no se lleva a cabo, impidiendo así la activación del linfocito T. Al realizarse la unión TCR-MHC-péptido y la unión de los correceptores, se fosforilan las tirosinas de las estructuras de activación tirosínica del receptor inmunitario (ITAM), iniciándose una cascada de traducción de señales. Para que esta activación se lleve de una forma más eficiente, los

Anteriormente hablamos sobre la presentación del antígeno por parte de las APC, esta presentación a los linfocitos vírgenes se lleva a cabo en los órganos linfoides secundarios, el TCR es quien se une al MHC de la APC para comenzar la activación del linfocito T CD4+; como se muestra en la **figura**

correceptores CD4 en el linfocito cooperador y CD8 en el linfocito citotóxico, son necesarios. Estos correceptores llevan la Lck en su cola, la Lck es una familia de tirosina cinasas que se unen a las ITAM de las proteínas CD3 y  $\zeta$ . Son correceptores porque se unen a moléculas del MHC reconociendo una parte del mismo ligando que interactúa con el TCR. Al activarse la cascada de señalización se generan enzimas que activan factores de transcripción los cuales se unen a las regiones que regulan varios genes de los linfocitos T. Diferentes vías de transducción de señales citoplásmicas activan diferentes factores de transcripción, los linfocitos T siguen los mismos principios para codificar receptores para citocinas y moléculas efectoras aunque diferentes genes pueden responder a diferentes combinaciones de factores de transcripción, los cuales son tres; el factor nuclear de los linfocitos T activados o por sus siglas en inglés NFAT, la AP-1 y el NF- $\kappa$ B (21).

El NFAT ayuda a la expresión de genes que codifican las citocinas IL-2, IL-4, TNF y otras citocinas; la AP-1 activa la síntesis de la proteína Fos y la fosforilación de la proteína Jun, además de que se asocia a otros factores de transcripción cuando se combina con NFAT, por último, NF- $\kappa$ B, es esencial para la síntesis de las citocinas. Esta vía es importante para las repuesta generadas por los receptores tipo Toll y las señales que generan muchas de las citocinas. Los linfocitos cooperadores, al ser activados, salen de los órganos secundarios a la circulación para así concentrarse en el lugar donde se encuentra el agente infeccioso, al mismo tiempo comienza la expansión clonal de

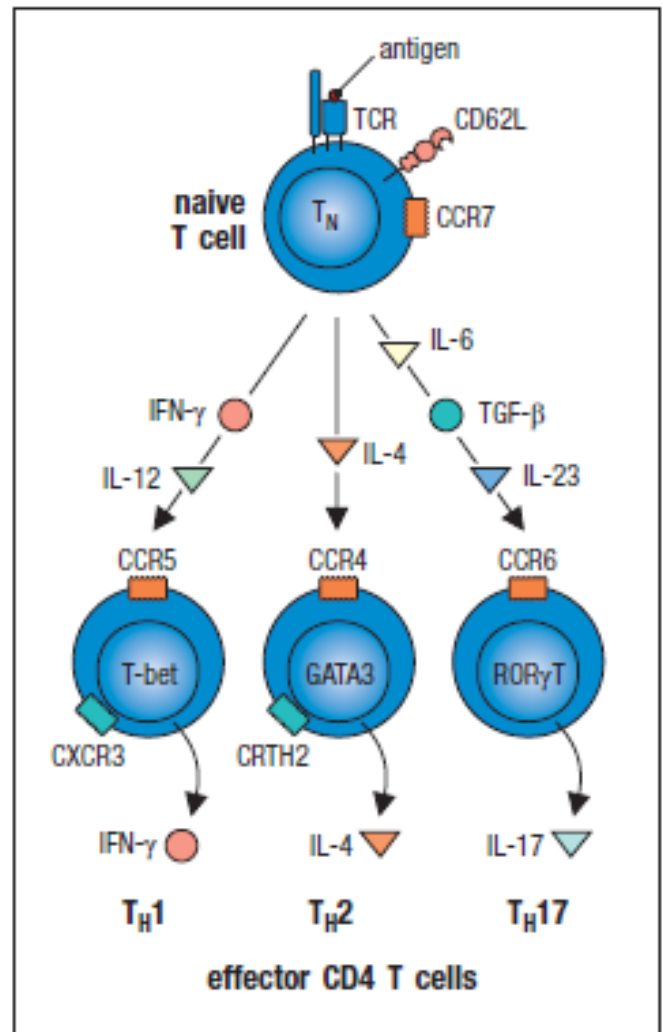


Figura 10: Diferenciación de subtipos de linfocitos T CD4. Modificado de Murphy, 2017



los linfocitos específicos y muchos se quedan almacenado para futuros ataques.

Esta activación, inicia las funciones efectoras de los linfocitos, que finalizan con la maduración de los linfocitos citotóxico CD8, de los linfocitos B y células de inmunidad innata, como los fagocitos, que su acción se activa desde antes, pero gracias a los linfocitos T, su acción de fagocitosis aumenta; todo con el objetivo de eliminar a los microorganismos patógenos. Otro mecanismo activado es la inflamación, que consiste en una respuesta fisiológica al daño, mediada por poblaciones celulares, en especial linfocitos CD4+ y respuestas químicas como la producción de citocinas, es una forma para mediar y hacer la reparación del tejido dañado, pero si es una respuesta descontrolada, el daño al tejido puede ser mayor, a esto se le denomina hipersensibilidad de tiempo retardado (HTR), la cual es causa de gran parte de los problemas patológicos asociados a ciertos tipos de infección.

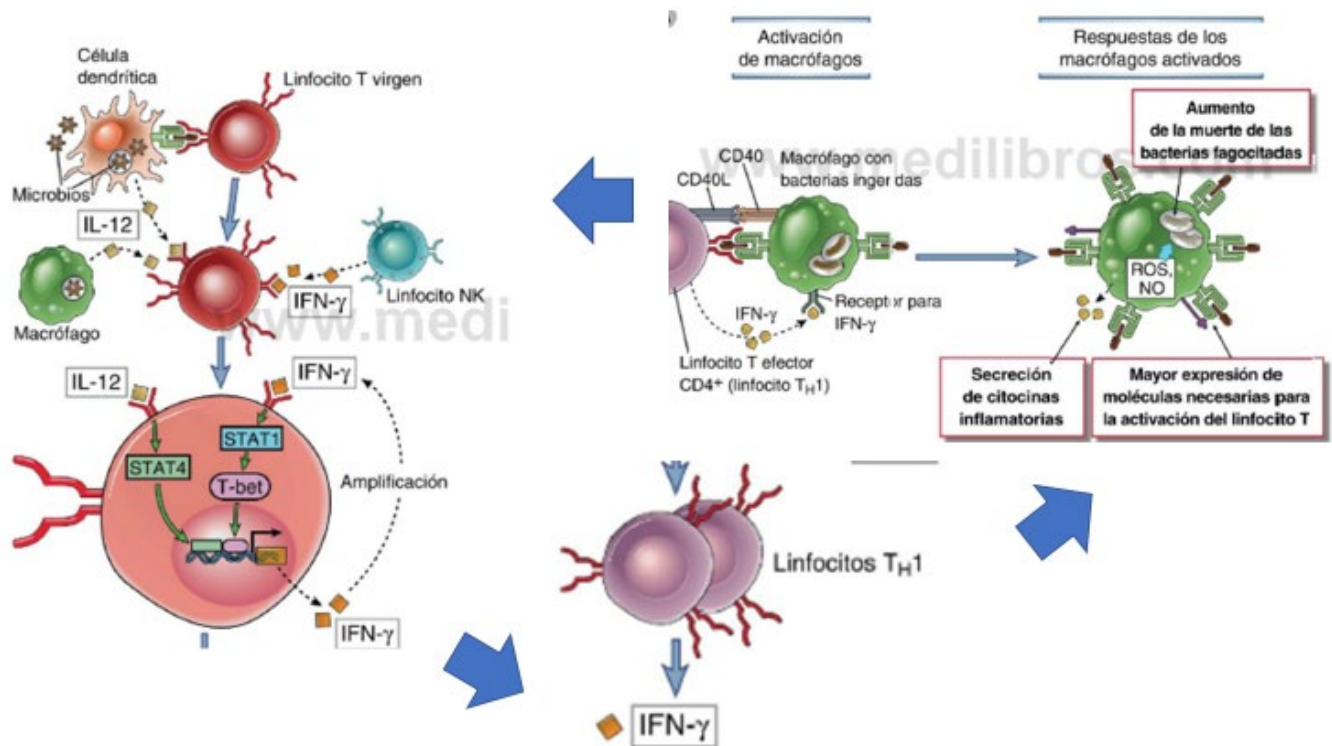


Figura 11 Subgrupo de Th1 y el eje IL12-IFNγ. Modificado de Abbas 2009



---

---

Las citocinas producidas median las funciones de los linfocitos cooperadores CD4, generando poblaciones de linfocitos CD4+ con diferentes funciones efectoras, que pueden ser distinguidas por las citocinas que estas producen. Los principales subgrupos de linfocitos efectores son llamados T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub> (Figura 10) (22).

El perfil T<sub>H1</sub> (**Figura 11**) es inducido principalmente por microorganismos intracelulares, expresan cantidades altas de los receptores para quimiocinas CXCR3 y CCR5 que se unen a quimiocinas elaboradas en los tejidos durante las respuestas inmunitarias innatas contra infecciones, que se encuentran en los macrófagos, estos a su vez producen IL-12 e IL-18, las células NK pueden producir INF- $\gamma$ , que puede estimular al linfocito a este perfil. Estas citocinas reconocidas por el linfocito CD4+ virgen, estimulan vías de señalización para que, IL-2 estimule STAT4 y el INF- $\gamma$  a STAT1 (Bowen et al, 2008), estos se estimulan al factor T-bet, que se acopla al ADN, para así el linfocito comience a liberar INF- $\gamma$  al medio extracelular. El INF- $\gamma$  esencial para los linfocitos T<sub>H1</sub> (25) tiene como funciones estimular a los macrófagos, además de aumentar la producción de las enzimas que estas involucradas en la producción de sustancias microbidas y promueve en los linfocitos B el cambio de subclases para la producción de IgG. Las respuestas del perfil T<sub>H1</sub> son acompañadas de lesiones tisulares en respuesta al combate contra un microorganismo, debido a los productos microbidas liberados por los macrófagos activados y los neutrófilos que son capaces de dañar el tejido normal y que no discriminan entre los microbios y el tejido del anfitrión. Esta respuesta de T<sub>H1</sub> debe de estar controlada estrictamente para prevenir un proceso patológico.

El perfil  $T_{H2}$  (**Figura 12**) es el mediador de la defensa independiente del fagocito, en la que los eosinófilos, y células cebadas desempeñan la función central, expresan los receptores para quimiocinas CCR3, CCR4 y CCR8, que reconocen quimiocinas que se expresan mucho en los lugares de infección helmíntica o las reacciones alérgicas, es por eso que son importantes para erradicar infecciones contra este tipo de microorganismo. Al producirse la respuesta contra los helmintos, la APC activan al linfocito, provocando que este comience la producción de IL-4, realizando una retroalimentación, en pocas palabras, el mismo linfocito T se estimula así mismo, activando STAT4 y junto con la inducción de las señales del TCR, estimulan GATA3, estos dos factores comienzan la transcripción de genes para producir las citocinas IL-4, IL-5 e IL-3. GATA3 al unirse al gen impide la transcripción  $INF-\gamma$ , impidiendo que el linfocito T cambie al perfil  $T_{H1}$ . IL-4 e IL-13 actúan sobre los linfocitos B, estimulando la producción de IgE además de que ayudan a una activación alternativa de los macrófagos.

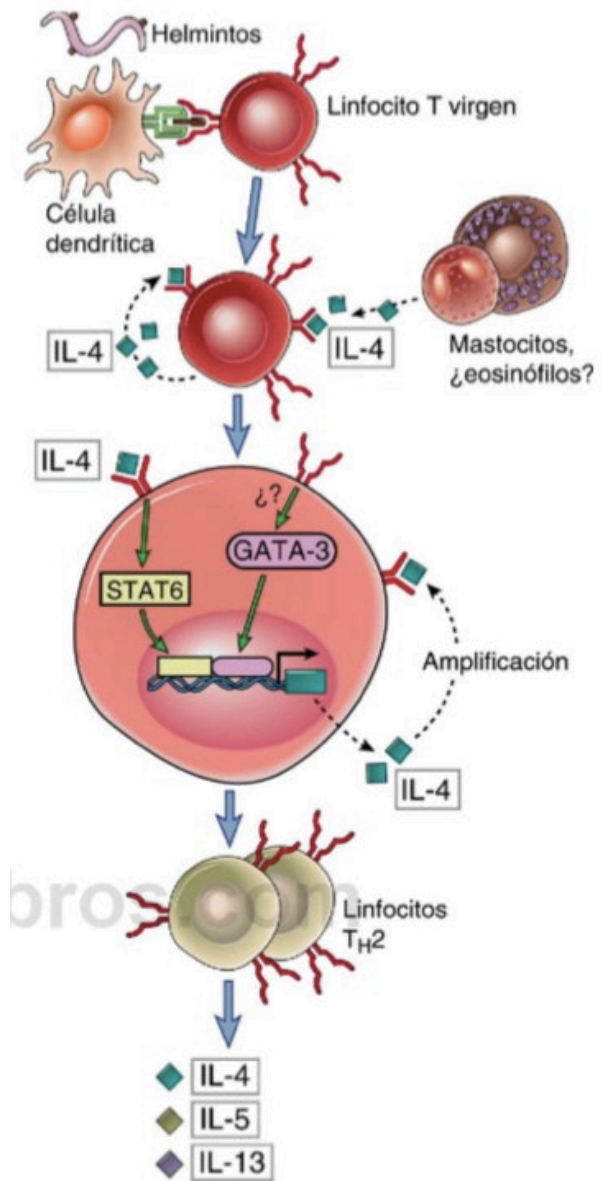


Figura 12: Subgrupo  $T_{H2}$ . Extraído de Abbas, 2009

La activación de linfocitos y la producción de citocinas, son importantes para mejorar la respuesta innata, además de que ayuda a la activación de los linfocitos B y llevar a cabo la producción de anticuerpos, que son los principales actores en la respuesta adaptativa humoral.

---

---

### 2.2.5 Respuesta Humoral

Los linfocitos B son el elemento importante para el desarrollo de la respuesta humoral, ya que ellos al madurar comienzan a producir anticuerpos, los cuales son esenciales para la protección de microorganismo extracelulares y las toxinas que pueden producir daños en el organismo hospedero. Las acciones efectoras de la inmunidad humoral, son la neutralización de las toxinas que son producidas por los microorganismo patógenos y la opsonización de agentes infecciosos, este proceso hace más atrayente al microorganismo infeccioso, para que sea fagocitado de una forma más eficiente y también le ayudan al inicio de la activación del complemento, que es unos de los elementos importantes de la inmunidad innata.

El linfocito B, al encontrar un antígeno específico o al ser activado por un linfocito folicular, puede realizar expansión clonal, unos pueden resguardarse para producir células de memoria, que, en posteriores ataques, producirán anticuerpos específicos contra el agente infeccioso; otras clonas maduraran para volverse células plasmáticas, que son específicamente estas las que producen anticuerpos en los ganglios linfáticos, bazo y medula ósea, posteriormente entran a la circulación viajando por todo el cuerpo. Estos igual pueden ser producidos en tejidos linfáticos asociados a mucosas y son trasportados a la luz del órgano mucoso y por último pueden ser trasportados a través de la placenta hacia la circulación del feto, volviéndose uno de los principales mecanismos de inmunidad que recibe el feto (21)(24).

Los anticuerpos son estructuras proteicas en forma de Y, la mayoría de estos son globulinas gamma, que migran rápidamente, recibiendo así el nombre de inmunoglobulinas (Ig). La estructura de las Inmunoglobulinas es similar entre sí, constan de dos cadenas pesadas y dos ligeras, pero existen regiones que le brindan una gran variabilidad para identificar distintos tipos de antígenos. Existen cinco isotipos de anticuerpos, la IgA que se encuentra en su forma activa como un dímero, que funge como principal defensa de los tejidos mucosos neutralizando toxinas, la IgD se encuentra como monómero principalmente como receptor de los linfocitos B vírgenes, la IgE que su función principal es la protección contra helmintos además de tener un papel en las

reacciones de hipersensibilidad. La IgG es una de las principales inmunoglobulinas que brinda protección a nivel sistémico, además de que esta es la única inmunoglobulina que puede transferirse por placenta al feto; se encarga de la opsonización y activación del complemento y, por último, la IgM es la Ig de mayor tamaño, se puede encontrar como receptor de superficie de linfocitos B inmaduros y en circulación son más eficientes para activar el complemento. Las inmunoglobulinas se pueden encontrar unidas a la superficie de la membrana de los linfocitos B vírgenes, estos actúan como receptores para antígeno, y no tienen función efectora de neutralización y opsonización y como se mencionó anteriormente, en su forma secretada por las células plasmáticas (**Figura 13**).

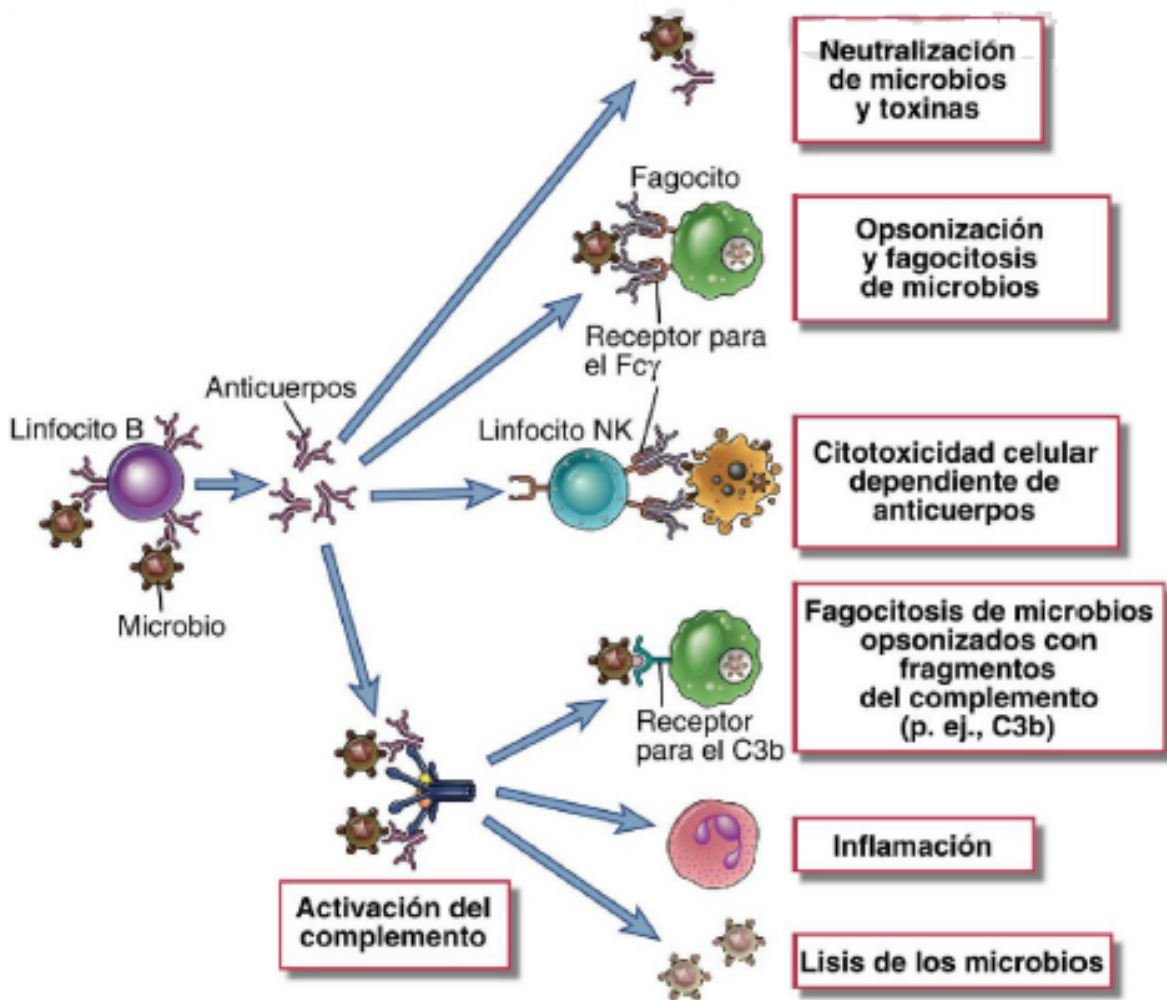


Figura 13: El linfocito B y sus diferentes actividades. Extraído de Abbas, 2009

La activación del linfocito B, es mediada de igual forma por un receptor de superficie, el cual es llamado receptor de linfocito B (BCR). Este receptor es específico de linfocito B

---

---

que no ha sido activado, ya que al encontrarse con un antígeno, el linfocito B aumenta de tamaño su aparato de Golgi, para así maximizar su producción de anticuerpos y pierde en su superficie su BCR.

Las funciones efectoras de los anticuerpos, regulan o intensifican actividades de la inmunidad innata, en caso que los anticuerpos no puedan eliminar la infección la inmunidad celular se activa para erradicar al microorganismo invasor. Se mencionó anteriormente que si la respuesta celular o humoral no es controlada puede llevar a procesos patológicos como es el caso de los pacientes con sepsis en la terapia intensiva, que cursan por un proceso en el cual su sistema inmune esta desregulado, puede existir una supresión de la respuesta o en algunos casos una respuesta exacerbada, complicándose en un choque séptico y provocando en muchos casos la muerte, a continuación, se describirá brevemente los aspectos importantes de este síndrome.

### 2.3 Resistencia antimicrobiana, Sepsis e inmunidad

La batalla contra los agentes patógenos ha existido desde siempre, antes del descubrimiento de los antibióticos, la mortalidad era muy alta. Este descubrimiento fue un gran paso para avanzar en el combate contra las bacterias. Sin embargo, en las últimas décadas, el uso indiscriminado de estos fármacos ha logrado que las bacterias volvieran a tener un paso delante de la humanidad, gracias a la resistencia que han generado. La resistencia a los antibióticos se ha definido de una forma operacional donde se clasifica a la bacteria como resistente o susceptible dependiendo de la posibilidad de tratar la infección que esta ocasiona (26). Sin embargo, la resistencia a los antibióticos es un fenómeno complejo que se debe de estudiar desde diferentes perspectivas, no solo desde la farmacodinamia y farmacocinética del antibiótico, si no desde los aspectos moleculares y genéticos que tiene el microorganismo (27). Genéticamente las bacterias tienen la capacidad de adaptarse a los antibióticos por dos maneras, la primera mediante la mutación de sus genes que de igual manera está asociado a los mecanismos de acción de compuesto; la segunda forma que utilizan es la adquisición de ADN externo por una transferencia de este, que codifica determinantes de la resistencia.

---

---

La resistencia a los antibióticos es un problema de gran relevancia, sobre todo en el aspecto clínico, ya que el paciente al ingresar al hospital, su sistema inmune puede encontrarse suprimido, haciéndolo susceptible a los agentes patógenos que se encuentran en el hospital, muchos de estos patógenos, han desarrollado resistencia a los tratamientos. Si el microorganismo no se enfrenta al tratamiento y la inmunidad innata falla en realizar su acción, estos pueden pasar a nivel sistémico y comenzar el desarrollo de sepsis.

La definición de sepsis es muy compleja, ya que abarca distintos elementos, originada principalmente por una infección. El cuerpo responde de una manera inapropiada ante esta infección (28). Viéndolo desde de la historia natural, se han englobado varios conceptos de fases que preceden a la sepsis hasta finalizar en el shock séptico. El inicio se da por algún daño provocado por un trauma o daño a algún órgano (por ejemplo, pancreatitis), la entrada de un agente infeccioso al romperse alguna de las barreras inmunológicas o una disfunción de la respuesta innata, la cual provoca que un agente infeccioso de la microbiota se vuelva patológica. Esta infección en un principio puede ser contenida en epitelio, pero esta llega a diseminarse a torrente sanguíneo, a este proceso se le llama bacteremia. Esto provoca una respuesta inflamatoria conocida como síndrome inflamatorio sistémico o SIRS, el cual se caracteriza por presentar dos o más de los siguientes criterios como(29) :

- Temperatura mayor de 38°C o menor a 36°C
- Una frecuencia cardiaca mayor de 90 latidos por minuto
- Taquipnea mayor de 20 respiraciones por minuto o una PaCO<sub>2</sub> menor de 32 mmHg
- Leucocitos por encima de 12,000 o por debajo de 4,000 cel/mm: o bien 10% de formas inmaduras (bandas).

Dependiendo de la gravedad de los síntomas puede evolucionar en sepsis, sepsis grave y shock séptico, la sepsis es definida en un continuo de la SIRS, provocada por un agente infeccioso; la sepsis grave se define como sepsis más disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión (hiperlactatemia, oliguria, alteraciones en el estado mental) (30). En caso del Shock séptico, al no ser tratada la sepsis, evoluciona a este estado de gravedad,

---

---

caracterizado por hipotensión secundaria a sepsis con presión arterial sistólica (TAS) <90 mmHg o disminución >40 mmHg en relación con la presión arterial basal a pesar de la administración de líquidos (31), esta definición es controvertida y poco específica, ya que incluye prácticamente cualquier infección, independientemente de la gravedad o su repercusión sistémica. En el 2016 se publicó el tercer consenso para la definición de las sepsis y el choque séptico (Sepsis-3), definiéndola como “un trastorno orgánico potencialmente mortal provocado por una respuesta desregulada del huésped a la infección” (32). Para el diagnóstico clínico además de basarse en la infección que presenta el paciente se utiliza la escala de evaluación de fallo orgánico secuencial (SOFA, Tabla 3), si el paciente llega a presentar un puntaje  $\geq 2$ , sin embargo, el uso del SOFA para un pronto diagnóstico no es muy práctico, es por eso que se adaptó el uso de SOFA rápido (qSOFA), el cual permite una pronta identificación de los pacientes con infección que tienen un pronóstico malo. El qSOFA se considera positivo si cumple por lo menos 2 de los siguientes criterios.

- Frecuencia respiratoria mayor o igual a 22 RPM
- Estado de conciencia alterado (Escala de Glasgow menor a 15)
- Presión arterial sistólica igual o menor a 100 mmHg

**Table 1** Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment Score.<sup>B</sup>

System	Score				
	0	1	2	3	4
<b>Respiration</b>					
PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> , kPa	≥53.3	<53.3	<40	<26.7 with respiratory support	<13.3 with respiratory support
<b>Coagulation</b>					
Platelets, x10 <sup>9</sup> /L	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Liver</b>					
Bilirubin, μmol/L	<20	20–32	33–101	102–204	>204
<b>Cardiovascular</b>					
MAP, mm Hg	≥70	<70			
Catecholamine dose, μg/kg/min			Dopamine <5 or dobutamine	Dopamine 5.1–15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1
<b>Central nervous system</b>					
GCS	15	13–14	10–12	6–9	<6
<b>Renal</b>					
Creatinine, μmol/L	<110	110–170	171–299	300–440	>440
Urine output, ml/day				<500	<200

GCS, Glasgow Coma Scale; MAP, mean arterial pressure.

A change in score of 2 or more in the presence of infection is a diagnosis of sepsis. This must prompt the clinician to initiate sepsis management bundles.

*Tabla 4: Escala de evaluación de fallo orgánico. Extraído de Singer, 2016*

Esto permite al personal de salud investigar si existe una disfunción orgánica, iniciar o escalar una terapia apropiada para el paciente y observar y existe una remisión en los cuidados críticos o un incremento en el monitoreo del paciente.

En el caso de la sepsis neonatal, se define como una condición sistémica ocasionada por una bacteria, virus u hongo (levaduras) que da origen a cambios hemodinámicos y otras manifestaciones clínicas (33). Al igual que la definición de las sepsis en adulto, aun no se llega a un consenso claro y su diagnóstico no solo se trata de aislar al patógeno, sino que se pueden desarrollar una respuesta inflamatoria sistémica. Se debe recordar que durante el crecimiento intrauterino, el producto depende completamente de la madre, está completamente aislado por la barrera placentaria, la cual impide que ningún agente extraño pueda tener contacto con él, pero el desarrollo de los órganos es lo que le permite enfrentarse a su medio externo, de la misma manera, el desarrollo de los componentes celulares y de la producción de citocinas, que son fundamentales para la activación y maduración de las células linfoides, en caso de ser prematuro el desarrollo de esta respuesta es mucho más inmadura que la de un neonato a término. En otras palabras, la inmunidad del recién nacido no está madura, esto lo puede hacer proclive a alguna infección, al mismo tiempo la maduración de la inmunidad es multifactorial ya que puede



---

---

modificarse por factores obstétricos, procedimientos invasivos en el neonato y la administración de una gran variedad de fármacos. Un recién nacido pretérmino es mucho más propenso a desarrollar sepsis neonatal. De forma breve podemos mencionar que el desarrollo del sistema inmune se da a partir de la quinta y octava semana de gestación, al finalizar de formarse el sistema cardiovascular del embrión, los precursores de granulocitos y macrófagos se encuentran entre la sexta a octava semana en el saco vitelino, posteriormente se localizan en el hígado fetal y en la medula ósea (octava a doceava semana) (34). La actividad fagocítica de los neutrófilos y macrófagos, la síntesis de Inmunoglobulinas y la actividad tanto del complemento como de los linfocitos no está completamente desarrollada haciendo al recién nacido propenso a desarrollar infecciones (35).

La maduración de linfocitos B se realiza en dos etapas importantes, las células pre B, se encuentran en el hígado a partir de la 8va semana de gestación, posteriormente los linfocitos B se localizará en la medula ósea, donde adquirirán los receptores para migrar a los órganos linfoides secundarios, donde llevarán a cabo la activación y maduración dependiente de la presentación del antígeno. Con respecto a las inmunoglobulinas la IgG es la única que puede atravesar la placenta, se detecta a partir de la semana 17 y a la 33 alcanza los niveles maternos (1,031 mg/dl) incrementándose hasta un 110%, esto se debe a que además de la síntesis de IgG del neonato también reciba la IgG materna (36). La síntesis de IgM comienza a partir de la 10 SDG (semana de gestación) y comienza a incrementar a partir de la 12 SDG, su concentración es equivalente al 10% del adulto en el recién nacido a término (11mg/dl vs 99 g/dl). Debido a esto los neonatos pretérmino tiene una gran desventaja en cuanto protección humoral, a causa de que los niveles de anticuerpos son mucho menores que la de un neonato a término.

Los linfocitos T se pueden detectar en las primeras semanas de gestación, se pueden localizar los precursores de los linfocitos T desde la semana 7, estos migran del saco vitelino, hígado y medula ósea hacia un timo rudimentario a la 8va SDG. En la semana 14 se encuentran linfocitos T CD4+ CD8+ en el hígado fetal y en el bazo, y los linfocitos CD4+ son detectables en ganglios linfáticos. El porcentaje de linfocitos T en el feto aumenta gradualmente durante el segundo o tercer trimestre del embarazo hacia el sexto

---

---

mes de vida (36). Se ha observado que, tanto en modelos murino como en humanos, predomina el subtipo  $T_{H2}$  sobre el subtipo  $T_{H1}$ ; esto es debido a la producción de IL-2 que esta disminuida, debido a esto hay una mala respuesta en los procesos infecciosos. La expresión de  $\alpha\beta$ TCR, CD3, CD4, CD5, CD8 y CD28 en el feto y el neonato son similares a las del adulto, la producción de citocinas se encuentra disminuida en los neonatos, esta capacidad de expresión aumenta en el primer año de vida, es por eso la falta de maduración de la respuesta celular neonatal, ya que aún no se encuentra completamente madura en contra de las infecciones.

La sepsis neonatal se puede clasificar dependiendo de la edad y el tiempo de aparición de la sepsis, esta puede ser sepsis de aparición temprana o tardía. La sepsis de aparición temprana se da en las primeras 72 hrs de vida extrauterina, por lo regular estas infecciones se transmiten durante el parto por medio de transmisión de la madre hacia el neonato. La sepsis de aparición tardía ocurre entre los 3 y 7 días de la vida extrauterina, y es atribuida a microorganismos que se adquieren en el ambiente intrahospitalario o en la comunidad.

La respuesta fisiopatológica aún no se tiene muy clara, ya que se engloban una gran cantidad de factores que aterrizan en un fallo en la respuesta inmunológica, desencadenando en si el fallo multiorgánico. Una de las teorías que explica su fisiopatología es una respuesta inflamatoria amplificada que sobrepasa los mecanismos de regulación negativa (37). En un inicio la virulencia del microorganismo puede desencadenar los mecanismos de la respuesta inmune, que más tarde se amplifican generando los distintos síntomas que desencadenan los efectos nocivos a los tejidos que se encuentran localizados lejos del foco inicial de la infección.

Al inicio el reconocimiento del agente infeccioso es iniciado por los PAMs, que desencadenan la respuesta inmunitaria innata, produciendo una activación y secreción de factores y citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6, IL-8, etc.) y antiinflamatorias (IL-10, IL-4, IL-1Ra), así como de otros factores como óxido nítrico o factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Todo esto provoca una alteración funcional de todos los tipos celulares del sistema inmunitario, se activan no solo las células de la inmunidad innata y se induce la maduración de la respuesta adaptativa, principalmente la expresión de

---

---

CD4+, hacia un perfil T<sub>H1</sub>, lo que perpetúa el daño inflamatorio. Al mismo tiempo el endotelio responde al aumento de citocinas mediante la expresión de moléculas de adhesión y factores de crecimiento que promueven una mayor respuesta inflamatoria y afectando a la coagulación. Esto genera así un fenotipo procoagulante no equilibrado y con inhibición de la fibrinólisis, esto provoca la trombosis en el lecho microvascular y dificulta la perfusión tisular, con lo que contribuye a la disfunción orgánica.

Todo esto resulta en una disfunción cardiovascular en la microcirculación, la circulación periférica macrovascular y disminuyendo el aporte de oxígeno por parte del corazón hacia otros tejidos, esto a su vez, produce hipotensión, que se acompaña de una reducción de la precarga ventricular, del volumen sistólico, del gasto cardíaco y del transporte de oxígeno sistémico. Se generan, entonces, respuestas compensatorias mediadas, por el sistema nervioso simpático que permiten restaurar inicialmente la perfusión, pero si no se revierte el mecanismo iniciador se pierde la capacidad de compensación y aparecen las complicaciones orgánicas por hipoperfusión. Finalmente, es frecuente (60%) que en la sepsis grave y el shock séptico aparezca una depresión de la función miocárdica en las primeras 24-48 h como consecuencia de los efectos directos o indirectos de moléculas circulantes, como el TNF- $\alpha$  o el óxido nítrico (28). La respuesta inmunitaria en la sepsis puede ser causadas por una desregulación de esta misma, la meta en los últimos años ha sido de poder definir y así acercarse más a un mejor tratamiento este síndrome o poder prevenirlo antes de que se agrave el estado de salud del paciente.

Algo esencial para el tratamiento de la sepsis es la valoración constante del paciente de la repuesta que tiene al tratamiento elegido y para hacer una correcta elección se debe hacer un correcto análisis sobre el microorganismo que está ocasionando la infección. La obtención de los cultivos debe ser antes de la administración del tratamiento antibiótico ya que la esterilización de los cultivos puede ocurrir en el plazo de minutos a horas después de la primera dosis del antibiótico adecuado, impidiendo así la correcta identificación del microorganismo y aumentando la tasa de resistencia al antibiótico que puede generar el patógeno. Al aislar un organismo infeccioso es posible la disminución gradual del tratamiento antibiótico primero en el momento de identificación y

---

---

posteriormente cuando se obtienen las susceptibilidades. La disminución gradual del tratamiento antibiótico es un pilar de los programas de gestión de antibióticos y se asocia a microorganismos menos resistentes, menos efectos secundarios y costos más bajos. Sin embargo, la relación riesgo/beneficio favorece la administración rápida de antibióticos si no fuera logísticamente posible obtener los cultivos en forma oportuna.

En los últimos años, se han buscado sustancias que puedan ayudar a modular la respuesta inmune, que la respuesta no sea exacerbada o que se active de manera eficiente, un inmunomodulador se define como aquella sustancia que interactúa con los elementos del sistema inmune y es capaz de aumentar o disminuir aspectos específicos de la respuesta inmune del hospedero (4). Una de estas sustancias que han mostrado gran efecto inmunomodulador ha sido la lactoferrina, de la cual se hablara a continuación.

## 3 Antecedentes directos

### 3.1 Lactoferrina como inmunomodulador

Se han realizado diferentes estudios en los cuales se ha comprobado las diferentes actividades que tiene la lactoferrina, en un estudio *in vitro* demostró ser un agente madurador de la respuesta adaptativa, al acelerar la maduración de los precursores de los linfocitos T al inducir la expresión de CD4 al activar vías de señalización (38) y en la maduración de linfocito B incrementa la expresión de receptor 3 del complemento e IgD (39). *In vivo*, modula la función de componentes humorales y celulares de la respuesta innata (NKs, Linfocitos T  $\gamma\delta$ , IFN $\alpha$ , INF $\beta$ , IL-18) y adaptativa a través de anticuerpos, ILs, linfocitos T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub> y B, todo esto evaluado por diferentes vías de administración, siendo la deposición bucal la que genero un mejor resultado (40) (41). La administración por vía intragástrica en ratones sanos por 4 o 6 semanas (40) aumentó las concentraciones basales de IgA e IgG en saliva y liquido intestinal, e incrementó los de anticuerpos IgA e IgG específicos contra la lactoferrina en liquido intestinal y suero y también IgM sérica a antilactoferrina, esta generación de anticuerpos antilactoferrina refleja la capacidad de la lactoferrina de unirse y activar células B y T vía receptor (42). En compuestos celulares de placas de Peyer o de células de bazo estimulados con la administrados por vía intragástrica con bLf, incremento un total de anticuerpos IgA e IgG, esto se atribuye a la capacidad de la bLf de afectar la función de los linfocitos T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>. (40) (41). En un modelo de estrés por inmovilización, se evaluó la respuesta inmune después de administrar Lf, mostro un efecto regulador debido a la producción de TGF- $\beta$  (43). Se ha visto que la Lf igualmente regula las repuestas innata y adaptativa por medio de la unión de los lipopolisacáridos (LPS) y CD14, interfiriendo en esta unión LPS-CD14, evitando así la activación de la vía de señalización de TLR4, que es importante en la patogénesis de la sepsis. (44)(45)

Otro estudio evaluó, las repuesta de IgA después de la administración de bLf en ratones sometidos a estrés (46). En el 2010 Drago-Serrano y colaboradores, en un modelo de infección *In vivo* de *Salmonella typhimurium*, evaluaron el efecto de la bLf administrada

---

---

oralmente y sobre la infección, resultando en un aumento de la sobrevivencia de los ratones infectados con *S. typhimurium* que fueron administrados con Lf además de que se observó que los niveles totales y de IgG e IgM en suero y IgA en intestino, contra las proteínas de esta bacteria (47).

El efecto de la bLf sobre los linfocitos B también ha sido demostrado, se evaluó el efecto de la administración Lf en la generación de linfocitos B-1 y B-2 peritoneales, encontrando que la Lf incrementa significativamente la producción de células B-1, pero no la B-2 (48). Otro estudio evaluó el efecto de bLf en la respuesta en los sitios inductores y efectores y como esto influenciaba en la producción de IgA en el segmento distal de intestino delgado de ratón, el resultado fue que bLf regula de manera positiva la producción de IgA e IgM, aumentando la maduración de células plasmáticas IgA+ y IgM+ (49).

A pesar de los distintos estudios realizados con modelos animales, aun no se sabe si todos estos resultados de la bLf se pueden transpolar en humanos. El uso clínico de la Lf se ha ido desarrollando lentamente, su uso comenzó como suplemento en neonatos y niños sanos, siendo Japón el primer país donde se comenzó a usar en 1986 (50). Principalmente se ha evaluado el beneficio en el desarrollo del sistema digestivo e inmune en neonatos pretérmino y de bajo peso al nacer, además de que la reducción de casos de enterocolitis necrosante y sepsis neonatal(51) (52). Un recién nacido pretérmino es mucho más propenso a desarrollar infecciones, como la sepsis neonatal, o en algunos casos respuestas inmunológicas no reguladas, una de ellas es la enterocolitis necrosante. que se encuentra entre una de las enfermedades más comunes y mortales y difíciles de tratar en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN)(53), siendo su incidencia de 5 a 10% en neonatos menores de 1500 gr (54). Conforme a la guía de práctica clínica, la enterocolitis necrosante es definida como un proceso inflamatorio intestinal agudo, caracterizado por necrosis isquémica de la mucosa gastrointestinal, que puede producir perforación y peritonitis. Es por eso la importancia de buscar nuevos métodos para la maduración del sistema inmune en el neonato, y evitar la mortalidad en este tipo de enfermedades, sobre todo en un producto pretérmino o de bajo peso.

---

---

Manzoni y colaboradores en el 2007, evaluaron el efecto de la bLf sola y adicionada con *Lactobacillus rhamnosus* en 472 neonatos de muy bajo peso al nacer, en la prevención de sepsis, se vio la reducción de la incidencia de la sepsis en los neonatos tratados con bLf (55). Mas tarde, este mismo autor evaluó el efecto de bLf sobre las infecciones fúngicas, viendo una reducción de esta (56). En otro ensayo en Turquía, con 50 neonatos de muy bajo peso al nacer y nacidos a las 32 SDG, fueron divididos en dos grupos, uno donde se administraba un placebo que era solución salina y otro donde se administraba 200 mg al día de Lf, el grupo que fue administrado con Lf tuvo una menos incidencia de casos de sepsis y enterocolitis necrosante comparado con el grupo placebo (57).

En el caso de la sepsis en adultos, el número de ensayos clínicos es menor. La Lf se tienen como un candidato de péptido antimicrobiano (AMP's) para el tratamiento de infecciones que son resistentes a los antibioticos, además de que puede disminuir la repuesta que generan estos en el aumento de la producción de LPS, sin embargo, como solo ha sido probada en modelos murinos y no se conoce los efectos que pueda generar en un modelo humano. La talactoferrina alfa (TLf), es una forma recombinada de la lactoferrina, cuanta con estructura moleculares similares a la lactoferrina y su actividad biológica es similar a esta. En un estudio hecho por Jiang y colaboradores en el 2014, compararon la actividad de la hLf, la bLf y la TLf, las tres pueden internalizar las células intestinales y del hígado, sugiriendo que interactúa con ambos tipos de células activando posiblemente diferentes rutas de señalización, aunado a esto la Lf aumenta la proliferación de células intestinales, siendo la bLf la promovió una mayor generación de estas células (58).

Debido a esto se estableció un ensayo clínico en el 2013, por Guntupalli y colaboradores, en una segunda fase del estudio, el cual conto 194 pacientes con sepsis por lo menos con una disfunción orgánica que fueron asignados al grupo de la administración de TLf o con placebo(59). En esta fase del estudio, los resultados fueron que los pacientes con administración oral de TLf mostraron una menor tasa de mortalidad en un periodo de 28 días y este efecto se mantuvo por 6 meses. A pesar de estos resultados, la siguiente fase el estudio fue suspendido debido a que hubo un aumento de la mortalidad en el grupo administrado con TLf en un rango de 28 días (60).

---

---

Otro estudio que comparo el efecto de la Lactoferrina humana recombinante (RhL), comparo los resultados del efecto antiinflamatorio e inmunomodulador de la rhL administrada vía intraperitoneal en un modelo de ratón con los resultados del cultivo de la sangre de la sangre de pacientes que se encontraban en la terapia intensiva con la rhL (61), se observando en las muestras de pacientes una hiporeactividad de los LPS posterior a la administración de la Lf además de una regulación positiva de la producción de citocinas.

Estos estudios demuestran que el uso de la Lf puede llevar a diferentes beneficios en los pacientes, previniendo la aparición de estados patológicos que pueden llegar a complicarse.

### 3.2 Planteamiento del problema

La lactoferrina, al ser una proteína de origen natural y producida por el cuerpo humano, ha demostrado ser una candidata ideal debido a la gran gama de funciones terapéuticas que ha presentado, no solo como inhibidor directo del crecimiento de los patógenos, sino que es un generador de la señalización al unirse a distintos tipos de células, generando en ellas diferentes efectos y que en los últimos años se ha logrado que comiencen los estudios clínicos para la utilizarla como protección en neonatos para la prevención de enterocolitis necrosante y sepsis neonatal, y en pacientes posquirúrgicos o en terapia intensiva, mejora sus respuestas adaptativas al daño generado por la patología.

Un paciente que se encuentra hospitalizado, está en constante contacto con agentes infecciosos, además que se todas sus barreras inmunológicas están comprometidas, esto hace que el paciente sea un blanco fácil para la invasión de microorganismos y el constante uso de antibiótico, provoca que sea muy susceptible a desarrollar sepsis. En la actualidad, la batalla contra las bacterias que ocasionan problemas de salud, ha dado un giro muy alarmante. La resistencia a los antibióticos que han generado estos microorganismos se ha convertido en una realidad y lo cual complica bastante el tratamiento contra estos. Aunado a esto, muchos de los pacientes que se encuentran terapia intensiva, debido a sus distintas patologías, cursan por una respuesta



---

---

inmunológica descontrolada, provocando mayor daño en los tejidos y el fallo de la función de órganos vitales, además de la posible invasión por agentes patógenos por una falla del sistema inmunológico al estar comprometido. De la misma forma, los neonatos pretérmino, son más susceptibles a infecciones sistémicas debido a que tienen poca adaptabilidad al medio extrauterino, esto se puede ver en los recurrentes casos de enterocolitis necrosante y en sepsis neonatal. Aunado a esto, en los últimos años, la sepsis en adultos se ha convertido en una condición muy recurrente. Su incidencia mundial se calcula en 18 millones de casos por año, siendo más recurrentes en pacientes de la tercera edad, pacientes inmunosuprimidos y sobre todo la resistencia bacteriana que presentan muchos de los agentes infecciosos que son adquiridos en el hospital (29). En países desarrollados como Estados Unidos y Reino Unido, se calcula que una mortalidad de hasta el 50% y tiene un gran impacto económico ya que cuesta anualmente \$16,7 billones anuales a Estados Unidos. En caso de América Latina no hay datos concretos que nos hablen sobre la tasa de mortalidad y los costos que ocasiona, pero se sugiere que pueda ser peor la situación que en países desarrollados. Muchas de estas repuestas son generadas por un problema en la correcta activación y mantenimiento de las respuestas humorales y celulares, en lo cual se ha visto que la lactoferrina tiene un fuerte papel para la maduración y modulación de muchas de estas respuestas. Es por eso que se buscan sustancias que optimicen la respuesta inmunológica, su importancia reside en ser una terapia de apoyo para regulación de las respuestas exacerbadas, mejora, optimización y en algunos casos maduración del sistema inmunológico de muchos de los pacientes que se encuentran hospitalizados.

En la mayoría de los estudios donde se ha probado la lactoferrina (*in vitro* e *in vivo*), el desarrollo de la respuesta celular y humoral han sido evaluados un periodo de tiempo de 7, 14, 21 y 28 días, tiempo ideal para que las respuestas primarias y secundarias puedan generarse, pero ¿Existe una modulación más temprana sobre poblaciones linfocitarias T y B así como la producción de anticuerpos en ratones BALB/c sanos administrados con bLf por vía oral?

---

---

### 3.3 Justificación

La bLf es una sustancia que la mayoría de los mamíferos la genera y se ha demostrado tener una gran variedad de funciones, como su capacidad de captar hierro, antimicrobiana, su propiedad nutracéutica, inmunomoduladora. Debido a que tiene la capacidad unirse por receptores y ser introducida, comienza genera una respuesta en linfocitos T y B. Aunado a esto se ha demostrado que la bLf administrada oralmente favorece la inducción de linfocitos T cooperadores y que aumenta la producción de IgM, IgG e IgA, haciéndola una ideal inductora de la respuesta secundaria, pero muchos de sus mecanismos para la activación de la respuesta celular y humoral aún no están muy claro. La importancia del estudio es análisis del efecto de la bLf en el inicio de la respuesta celular y humoral en un modelo de ratón, como es que se va dando la modulación de estas respuestas, ya que su temprana activación con la bLf nos puede ayudar a optimizarla y que esta respuesta sea mucho más eficaz a la hora enfrentar algún microorganismo patógeno, todo esto que sea de una forma paulatina. Los estudios en animales nos brindan información para entender cómo es que lleva acabo la modulación de las respuestas inmunitarias en diferentes escenarios y pudiendo realizar diferentes repeticiones, ya que el uso de la lactoferrina en pacientes adultos con sepsis ha sido muy controversial y se han detenido las investigaciones como blanco terapéutico. En el caso de neonatos, el uso de la lactoferrina abre la posibilidad de aumentar la tasa de supervivencia, ya que la posible suplementación, puede hacer que el sistema inmune neonatal puede tener con mayor rapidez una correcta maduración, permitiéndole al neonato poder tener una mejor respuesta al medio extrauterino. La suma de este conocimiento generado, conjugado con los resultados que han aportado los ensayos clínicos actuales, ayudaran a transpolar estos resultados a la población y que se pueda emplear no solo en pacientes sanos, si no en pacientes con alguna patología, mejorando su calidad de vida y a reducir muchos de efectos secundarios que implica una larga estadía hospitalaria. De tal manera en el presente estudio pretende evaluar el tiempo que en que se da el efecto de la lactoferrina sobre el aumento de poblaciones de linfocitos CD4, CD8 y B, así como la producción de anticuerpo IgM e IgG.

---

---

### 3.4 Hipótesis

La administración de bLf tendrá un efecto temprano sobre los niveles de IgM e IgG así como en linfocitos T y B.

### 3.5 Objetivo General

Evaluar el efecto de bLf de la respuesta temprana sobre poblaciones de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+ y B en bazo, así como la producción de anticuerpos IgM e IgG en suero de ratones BALB/c sanos.

### 3.6 Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de linfocitos T (CD3+, CD4+, CD8+) en bazo
- Determinar el porcentaje de células B (B220+) en bazo
- Analizar la producción de IgM e IgG en suero de ratones

## 4 Metodología

### 4.1 Diseño de la investigación

Esta investigación fue cuantitativa experimental, analítico y prospectivo. En la cual se empleó un modelo de ratón que estuvo bajo condiciones controladas y que se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Escuela Superior de Medicina - IPN.

### 4.2 Validación del instrumento

Por tratarse de aparatos electromecánicos, la precisión y la exactitud fue validada por los fabricantes de los instrumentos y la exactitud que proporcionan. Además de que las técnicas realizadas dentro del laboratorio fueron estandarizadas para asegurar la replicación de los mismos, con resultados confiables.

---

---

### 4.3 Animales

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones BALB/c machos entre 8-12 semanas de edad, libres de patógenos intestinales y con peso de 25-30 gr, los cuales fueron proporcionados por el bioterio de la ESM del Instituto Politécnico Nacional. Posteriormente se colocaron en cajas a una temperatura controlada de (22-24°C) y en un ambiente con poco ruido, sin movimiento de las cajas y sin manipulación de los animales al momento de la limpieza y ciclos de luz-oscuridad 12:12. La dieta consistió en alimento estéril y agua *ad libitum*. El manejo y procedimientos que se realizaron en los animales se apegaron a los requerimientos que determina la norma: NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” de SAGARPA, y a la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio” National Research Council”. Además, para el manejo adecuado de los animales, así como para la elaboración del protocolo se usó la guía ARRIVE (62).

### 4.4 Lactoferrina Bovina

La lactoferrina bovina (bLf) saturada al 3% con Fe<sup>3+</sup> se adquirió de manera comercial en NutriScience Innovations (Trumbull, CT, USA), se preparó una disolución con agua inyectable a una concentración de 5mg/100µl. Para confirmar la pureza de la bLf se realizó por electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% y se tiñó con azul de Coomassie brillante.

### 4.5 Diseño experimental

Se organizaron dos grupos con 24 ratones:

- 1) Grupo control: 3 ratones a los cuales se les administro un volumen de 100µl de solución salina (SS)

- 
- 
- 2) Grupos experimentales: se realizaron grupos de 3 ratones para el día 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 al cual se le administro 5mg/100µl de bLf de forma diaria por deposición bucal con una micropipeta.

#### 4.6 Obtención de suero

Los ratones tratados con bLf se sacrificaron en los días 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 y el grupo control, con una sobredosis de pentobarbital sódico antes de proceder a la recolección de las muestras.

Se obtuvo de 0.5 a 1 ml de sangre por punción cardiaca, colocándola en tubos cónicos, la sangre extraída se dejó por 10 minutos para remover el coagulo formado, posteriormente se centrifugo 3000 RPM por 7 minutos. De las muestras centrifugadas se recolecto el suero, el cual fue almacenado para su posterior lectura a -20°C.

#### 4.7 Obtención de linfocitos a partir de bazo

Posterior a la extracción de sangre se obtuvieron los bazos, los cuales se mantuvieron en PBS 1X frio, para ser disgregadas mecánicamente en una malla de acero inoxidable. Se obtuvieron las células de los líquidos que fueron filtrados en una tela, almacenado en un tubo cónico de 15ml, llevando el líquido a 13ml con PBS1x dejando que los eritrocitos se sedimenten por 10 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante a otro tubo cónico de 15 ml, el líquido obtenido se aforo a 10ml con PBS1x. Esto se centrifugo a 1500 rpm durante 10 min, obteniendo el sobrenadante y desechando el botón, el sobrenadante será re suspendido con 10 mL PBS 1x, manteniéndolo en refrigeración hasta su uso(4°C)

#### 4.8 Tinción de células para citometría

Las células obtenidas del bazo, se separaron mediante gradientes de Percoll 70/40, buscando obtener un el halo correspondiente a los linfocitos, estos se colocaron en tubos

de 500 µl, se colocaron 200 µl de RPMI para los linfocitos obtenidos del bazo adicionando 150 µl de las células en cada uno de los tubos en donde llevaron a cabo las tinciones las cuales se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se decantaron y se les adicionaron 10 µl del anticuerpo, que se incubaron 20 min en la oscuridad. Al Terminar la incubación se agregaron 500 µl de PBS, sometiéndolas a otro ciclo de centrifugación 1500 rpm x 5 min., se adicionaron a 300 µl de paraformaldehído para las tinciones extracelulares y se mantuvieron a 4 °C hasta su medición en el citómetro.

Para las tinciones intracelulares se adicionaron 200 µl de citofix/citoperm y se incubaron durante 20 min, consecutivamente se sometieron a un ciclo de centrifugación y se decantaron los sobrenadantes, adicionando 500 µl de permwash, se volvieron a centrifugar y decantar, posteriormente se adicionaron 10 µl del anticuerpo y se incubaron 20 min en la oscuridad, a esto se le adiciono 500 µl de permwash y se volvieron a centrifugar, que se decantaron y se mantuvieron con permwash a 4°C hasta su lectura.

Para la lectura con el citómetro, las muestras se filtraron y se colocaron en tubos limpios, se leyeron en el citómetro de flujo *FASC Calibur, BD* con el software *Cell Quest Pro V. 4.0*, se adquirieron 20000 eventos del área de linfocitos de un Dot blot de tamaño (FSC) vs granuliridad (SSC), para su análisis se utilizó el software *Summit V 4.0*.

A continuación, se presenta una tabla con las tinciones correspondientes para citometría:

Tinción	Anticuerpo
1. (extracelular)	Anti CD3 PE + Anti CD4 APC + Anti CD8 PerCP
2. (extracelular)	Anti CD11b FITC + anti CD80 PE+CD86APC+ anti B220 PerCP

## 4.9 ELISA

Se cubrieron placas de poliestireno de 96 pozos, se dividió la placa dos. En la primera mitad se cubrió con 50 µL de anticuerpo de captura IgM en una dilución de 1:400 (para la cuantificación de IgM total ) y la segunda mitad con IgG de captura en una dilución de 1:20000. Se dejaron durante toda la noche a 4°C, para posteriormente, realizar tres

---

---

lavados de PBS-Tween de 2 min cada uno, se realizaron tres lavados de PBS 1X de 2 min cada uno, bloqueando la placa con leche Svelty al 6% durante dos horas a 37°C, posteriormente se realizaron lavados de PBS-Tween y PBS 1X (3 de cada uno de 2 min), Se colocaron 100 µL del líquido obtenido del suero obtenido, la placa se deja toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con PBS-Tween y PBS 1X bajo las condiciones previamente establecidas y se colocó el anticuerpo anti IgM-HRP y anti IgG-HRP que se incubaron 2 h a 37°C, se realizaron lavados con PBS-Tween y PBS 1X, se revelara con solución de OPD (ortofenilendiamina), se detuvo la reacción después de 2 minutos para IgM y para IgG se detuvo a los 10 minutos con H2SO4. Posteriormente se realizó la lectura un lector de ELISA a 490 nm.

#### 4.10 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico GraphPad prism 7, llevando a cabo el análisis por medio de la prueba ANOVA de una vía, considerando significancia estadística cuando el valor de  $p \leq 0.001$  y  $p \leq 0.05$ .

## 5 Resultados

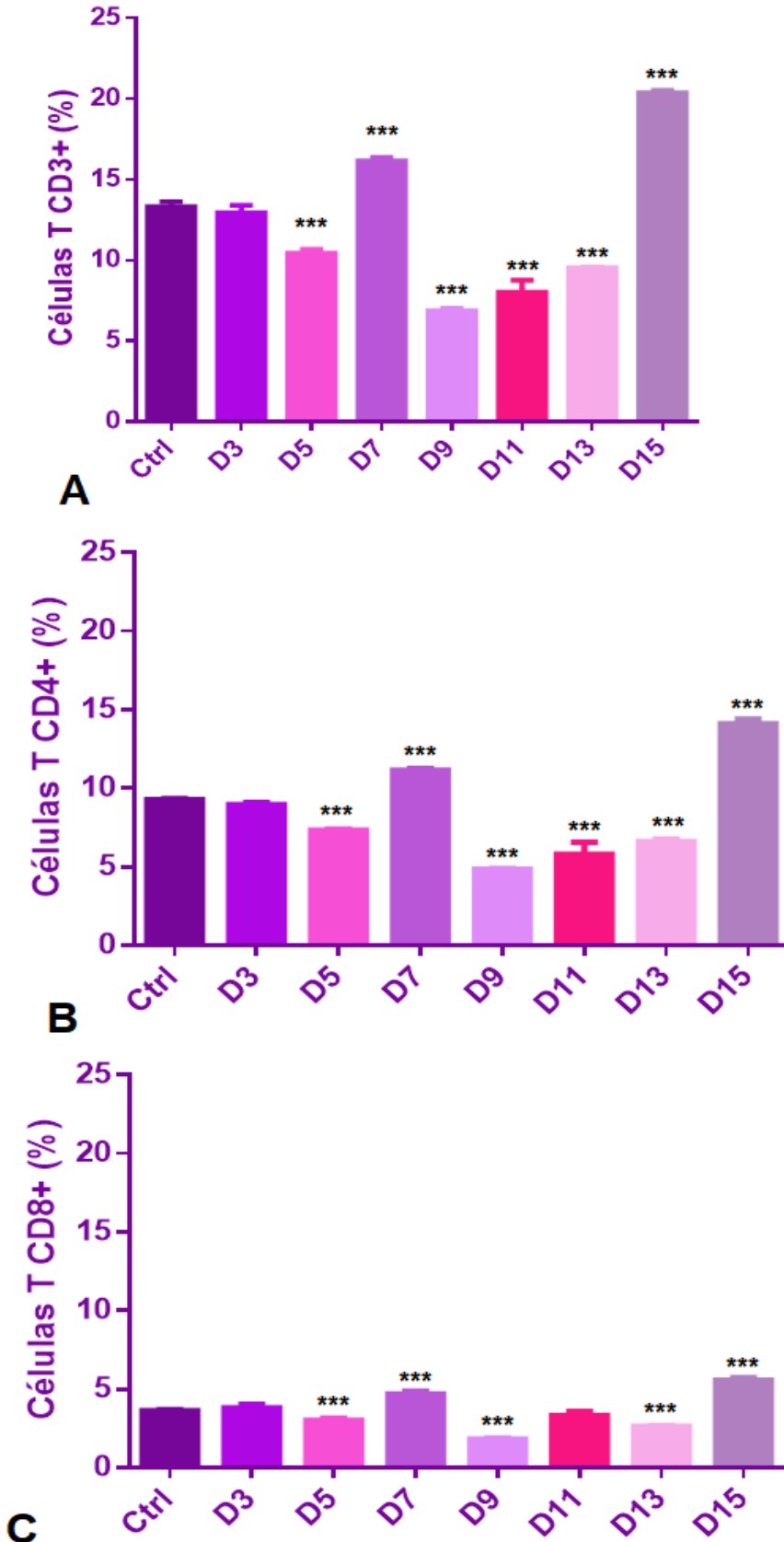
Se llevo a cabo la medición de las poblaciones linfocitarias de bazo, por medio de citometría de flujo, en la cual se dieron vio una dinámica en las poblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ a partir del día 5, dando como resultado un comportamiento de oleada. Con respecto a los linfocitos B, se observó un incremento desde el día 3 de la administración de la bLf la cual mostro el mismo comportamiento. Además, se midió la cantidad de IgM e IgG total el suero, la cual no muestra un cambio significativo hasta el día 15 de la administración.

A continuación, se presentan la interpretación detallada de los resultados.

### 5.1 Efecto de la bLf en la maduración de linfocitos T

En la figura 14 se muestran en los paneles A, B y C, los porcentajes de los linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ respectivamente, en el eje de la ordenada se observa el representa de linfocitos y el eje de las abscisas se presentan los grupos control, día 3, día 5, día 7, día 9, día 11, día 13 y día 15. En el panel A, perteneciente al porcentaje de linfocitos TCD3+, se aprecia una disminución significativa en el día 5 en comparación con el control ( $10.45 \pm 0.22$  vs  $13.33 \pm 0.30$ ,  $p \leq 0.001$ ), e incrementa al día 7, ( $16.15 \pm 0.21$ ,  $p \leq 0.001$ ) volviendo a disminuir en el día 9 casi a la mitad con respecto al control ( $6.8 \pm 0.16$  vs  $13.33 \pm 0.3$ ,  $p \leq 0.001$ ) haciendo un incremento gradual en los días 11 y 13 ( $08.01 \pm 0.76$  vs  $9.57$  vs  $0.08$ ,  $p \leq 0.001$ ), incrementando 7 veces más el día 15 con respecto al control ( $20.37 \pm 0.16$  vs  $13.33 \pm 0.3$ ,  $p \leq 0.001$ ).



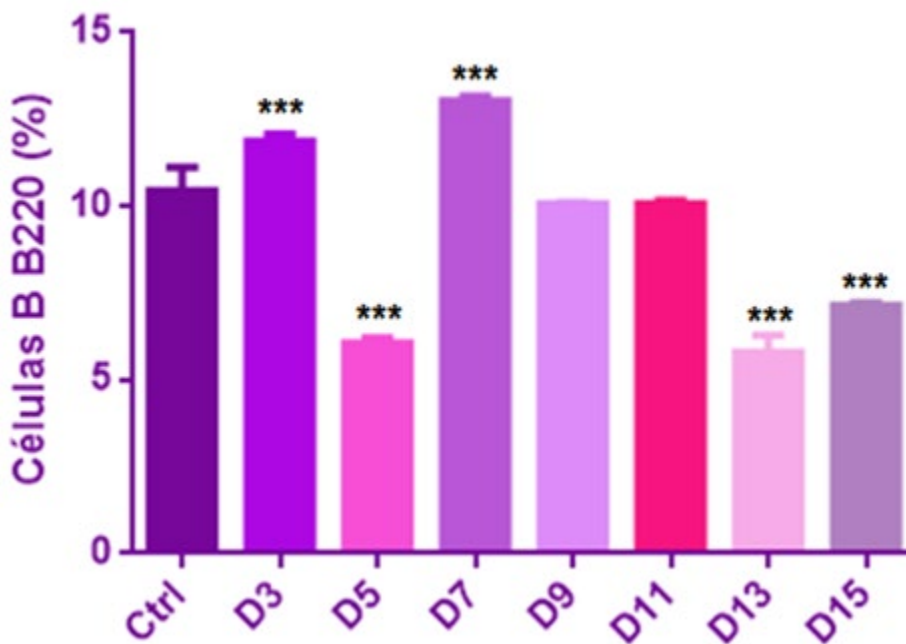


**Figura 14 Porcentaje de linfocitos T.** Se observa en la figura el efecto de la bLf en la expresión de TCD3+, TCD4+ y TCD8+, El panel A representa el resultado presentado es el porcentaje total de células que expresan TCD3+. El panel B muestra el resultado presentado es el porcentaje total de células que expresan TCD4+. Los datos se obtuvieron de 3 ratones por grupo, los datos se presentan como  $\pm$  SD, \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

En el caso de los linfocitos TCD4+ (panel B), el comportamiento es similar, hay una disminución dos veces menor comparándola con el control ( $9.28 \pm 0.06$  vs  $7.31 \pm 0.08$ ,  $p \leq 0.001$ ), incrementándose en el día 7 ( $9.28 \pm 0.06$  vs  $11.15 \pm 0.11$ ,  $p \leq 0.001$ ), para así volver a disminuir a la mitad en el día 9 con respecto al control ( $9.28 \pm 0.06$  vs  $4.83 \pm 0.04$ ,  $p \leq 0.001$ ). A partir de este día, el incremento es progresivo llegando a un punto máximo el día 15 donde puede observar un incremento cinco veces mayor con respecto al control ( $9.28 \pm 0.06$  vs  $14.10 \pm 0.29$ ,  $p \leq 0.001$ ).

En el caso de los linfocitos CD8+ (Panel C), observamos una disminución en el día 5 con respecto al control ( $3.01 \pm 0.14$  vs  $3.64 \pm 0.05$   $p \leq 0.001$ ), haciendo un incremento en el día 7 ( $4.69 \pm 0.17$ ,  $p \leq 0.001$ ), teniendo un comportamiento similar al de las otras dos poblaciones de linfocitos CD3+ y CD4+, que disminuyen en el día 9 con respecto al control ( $1.82 \pm 0.05$ ), haciendo un incremento progresivo en los siguientes días, siendo en el día quince la mayor expresión ( $2.62 \pm 0.05$  vs  $5.57 \pm 0.26$ ,  $p \leq 0.001$ ).

## 5.2 Efecto de la bLf en el aumento de linfocitos B



**Figura 15 Porcentaje de linfocitos B220+.** Efecto de la bLf en la expresión de B220 en los linfocitos B, el resultado presentado es el porcentaje total de células que expresan B220. Los datos se obtuvieron de 3 ratones por grupo, los datos se presentan como  $\pm$  SD, \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

---

---

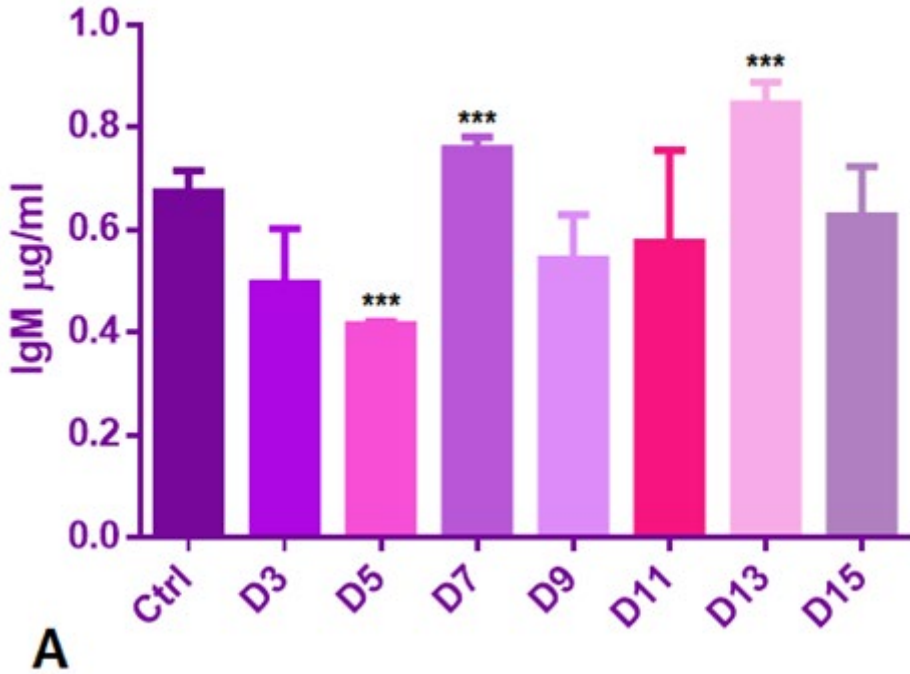
Con respecto a los linfocitos B, en la figura 15, se observa un incremento significativo en el día 3 posterior a la administración de bLf comparándola con el control ( $10.45 \pm 0.68$  vs  $11.87 \pm 0.21$ ,  $p \leq 0.001$ ), disminuyendo casi a la mitad en el día cinco con respecto al control ( $10.45 \pm 0.68$  vs  $6.07 \pm 0.14$ ,  $p \leq 0.001$ ). Al séptimo día de la administración existe un incremento mucho mayor al observado en el día 3 ( $11.87 \pm 0.21$  vs  $13.03 \pm 0.14$ ,  $p \leq 0.001$ ). En los siguientes días, la expresión de B220 se mantiene similar al control ( $10.06 \pm 0.03$  vs  $10.08 \pm 0.08$ ,  $p \leq 0.001$ ) y disminuyendo significativamente los días trece y quince ( $5.81 \pm 0.47$  vs  $7.14 \pm 0.07$ ,  $p \leq 0.001$ ).

### 5.3 EL efecto de la bLf sobre la producción de IgM e IgG

En la gráfica figura 16 se presenta la concentración de IgM (Panel A) e IgG (Panel B) en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en el eje de las ordenadas y los grupos se encuentran en el eje de las abscisas, la concentración se cuantifico mediante ELISA en suero de ratón. En el panel A, podemos observar que la concentración de IgM disminuye significativamente en el día 5 comparado con el control ( $0.67 \pm 0.04$  vs  $0.49 \pm 0.10$   $p \leq 0.001$ ), observándose un ligero incremento en el día 7 comparado con el control ( $0.67 \pm 0.04$  vs  $0.76 \pm 0.022$ ,  $p \leq 0.001$ ) volviendo a incrementar en el día trece ( $0.75 \pm 0.02$  vs  $0.84 \pm 0.04$   $p \leq 0.001$ ).

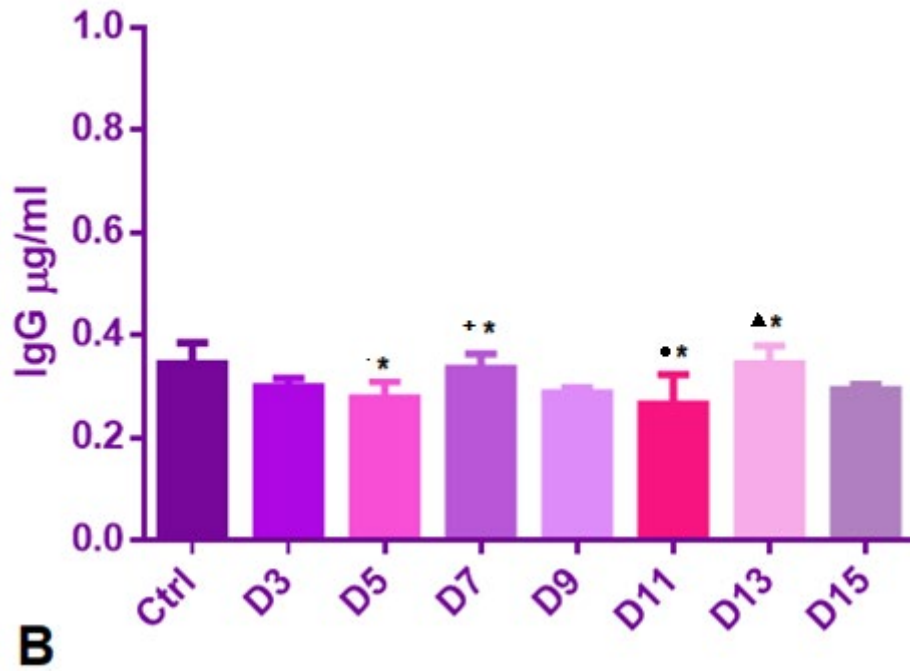
En el panel B, observamos que hay una ligera disminución comparado con el control en el día 5, ( $0.34 \pm 0.04$  vs  $0.27 \pm 0.03$ ,  $p \leq 0.05$ ) incrementándose nuevamente en el día 7 comparándolo con el día 5 ( $0.27 \pm 0.03$  vs,  $0.34 \pm 0.02$   $p \leq 0.05$ ). En el día 11 se puede observar la menor producción de IgG, comparándola con el día 7, ya en el día 13 donde se puede observar un aumento de la producción de IgG (vs  $0.33 \pm 0.02$  vs  $0.26 \pm 0.05$  vs  $0.34 \pm 0.03$ , \*  $p \leq 0.05$ ).

## IgM



**Figura 16. Producción de IgM y IgG total.** Se muestra el efecto de la bLf en la producción de IgM en suero, que se presenta en el panel A e IgG en suero, que se presenta en el panel B. Este resultado fue cuantificado por ELISA, los resultados son presentados en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Los datos se obtuvieron de 3 ratones por grupo, los datos se presentan como  $\pm$  SD, \*\*\*  $p \leq 0.001$  y \*  $p \leq 0.05$ , + comparación del D7 vs D5, ● Comparación del D11 vs D7, ▲ Comparación del D11 vs D13.

## IgG



## 6 Discusión

En el presente estudio se demostró el efecto de bLf en las poblaciones de linfocitos T y B, en una cinética más detallada de los primeros 15 días de su administración, a diferencia de otros estudios que se han llevado a cabo, que hacen en el análisis del efecto desde el día 7, 14, 21 hasta el día 28 de su administración. Se observa que a partir del día 5 hay modificación en la expresión tanto de linfocitos T (los cuales disminuyen) como de linfocitos B (que aumentan), lo cual nos habla que esta glicoproteína tiene un efecto el cual acelera la activación en la respuesta celular. Con respecto a la IgM e IgG, no se observan grandes modificaciones, hasta el día 13 donde se registra el máximo incremento. Es conocido que la lactoferrina es una glicoproteína que se puede encontrar en gran cantidad en la leche materna, con una concentración de 6g/L en el calostro (57), teniendo un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune.

Los mecanismos antimicrobianos de la Lf han sido bien estudiados y se tiene bien establecidos (8), ya que capta el hierro y desestabiliza la membrana de los microorganismos, además de que se une con LPS activando cascadas de señalización que liberan mediadores proinflamatorios (45), pero los mecanismos moleculares por los cuales la Lf lleva a cabo la maduración de la respuesta inmune adaptativa aún no se tiene muy claros. En un estudio con un modelo de células Jurkat, se vio que la Lf aumentaba la expresión de CD4, a través de la fosforilación de las MAP cinasas, además de que resulto ser tiempo y dosis dependiente, además de que se ve que la activación de la expresión de CD4 en los linfocitos por parte de la Lf se puede observar que es moderada y no descontrolada, evitando así el desgaste de energía, ayudando a que los linfocitos puedan activarse rápidamente cuando sea necesario (38). Esto se asocia a lo encontrado en el presente trabajo, donde al administrar ratones con una dosis de 100µl de bLf, se encontró que la proliferación de los linfocitos T tanto CD4 como CD8 (**Figura 14, panel B y C**) en los tiempos evaluados es paulatina. Por ejemplo, la tendencia para los linfocitos T CD4+, se observa una disminución al día 5, que incrementa en el día 7, volviendo a disminuir en los días 9,11 y 13 hasta llegar al día 15 donde puede observar el mayor porcentaje. En un estudio en ratones inmunosuprimidos en donde se les dio lactoferrina en el agua por 4 semanas, mostro como resultado un aumento en el

---

---

porcentaje de linfocitos CD4+ contrastado con ratones a los cuales se le había administrado concavalina A (63).

Lo resultados que se obtuvieron de linfocitos T CD8+, es similar al comportamiento que tuvieron los linfocitos T CD4+, al día 5 se observa una disminución, que incrementa en el día 7, volviendo a disminuir en los días 9 y 13, siendo el día 15 donde puede observar el mayor porcentaje. En un estudio donde se le administra bLf en el agua a perros adultos por 4 semanas, posterior a la administración se tomaron muestras sanguíneas, y observaron un aumento en los linfocitos CD8+ (64). De igual forma en un estudio con ratones, se administró bLf por 4 semanas, se tomaron muestras de sangre y se analizaron, observando un aumento de linfocitos CD4+ y CD8+ (65). Esta cinética se puede deber a que los linfocitos T son activados por la bLf y comienzan a migrar a diferentes tejidos como mucosas, para ahí poder comenzar su actividad.

Con respecto al porcentaje de linfocitos B, observamos que hay un incremento de estos al día 3 y 7 de la administración con Lf, pero disminuyendo drásticamente al día 15. Posiblemente los primeros días de la administración de bLf, comience la proliferación de estos para posteriormente migren a los sitios inductores y que puedan ser activados por los linfocitos T, en un estudio en ratones atímicos a los cuales se les administro bLf, se observó una proliferación de linfocitos B (66), además de que ya que se ha visto que la Lf actúa como un factor que ayuda a su maduración (39). Es importante mencionar, que la mayoría de estos estudios se han realizado en un tiempo de 4 semana y el análisis de las muestras han sido de los días 7, 14, 21 y 28, que son los días donde se establece la respuesta adaptativa. En el presente estudio, se analizó el efecto a dos semanas y se tomaron las muestras cada tercer día, para tener una cinética más detallada de cómo se iba a desarrollando esta respuesta.

Cuando se analiza la producción de IgM total, se puede observar de igual manera un incremento en la producción y de esta inmunoglobulina, principalmente en los días 7 y 13. Por otro lado, cuando se evaluó la producción de IgG total, se encontró no hubo un incremento considerable, sin embargo, si hubo un ligero aumento en los días 7 y 13, pero no al mismo nivel como lo encontrado para IgM. Esto coincide con lo reportado por Drago-Serrano en donde administraban bLf a tres grupos de ratones, un control uno con

---

---

una dosis de 5mg y otro con 100 mg de bLf, esto por 21 días. Además de tener otros 3 grupos donde tenían el mismo esquema de administración, pero al séptimo día fueron infectados con *Salmonella typhimurium*, continuando con el esquema de bLf por 21 días. Encontraron que el incremento de IgM como IgG totales se da a partir del día 7 en los ratones sanos, y es mucho mayor en la dosis de 100mg, en cambio si aumenta la producción de IgM e IgG en los ratones infectados, pero es menor a la de los ratones sanos (47); es importante resaltar que la medición que se hace de inmunoglobulinas totales, se debe a que esta posiblemente estén reconociendo al agente infeccioso y son específicas contra él, en cambio en el modelo sano, puede que no solo se estén produciendo inmunoglobulinas sin alguna especificidad si no que se están produciendo específicas para reconocer a la lactoferrina. En los resultados de la producción de IgG e IgM que se obtuvieron en los resultados, es posible que la bLf absorbida comience su efecto sobre las poblaciones de linfocitos en los primeros días de administración, pero debido a la formación de los complejos inmunes, en estos días se puede observar incluso una disminución de IgM e IgG con respecto al control en los resultados del experimento, que conforme avanzan los días muestra distintos picos de aumento y disminución. Esto demuestra la regulación que genera el organismo a la Lf, haciendo que esta no provoque una reacción de hipersensibilidad o tolerancia a esta y a su vez demuestra la importancia fisiológica que tiene esta.

Ciertamente al administrar la Lf de manera oral, una parte de esta se proteolisa por las enzimas gástricas, la lactoferrina humana es más resistente a la degradación que la bLf (67), a pesar de esto la Lf intacta y los fragmentos proteicos derivados de esta, tienen efecto tanto en niños y adultos, interactuando con el receptor interlectina-1. Además de que también son absorbidos por los enterocitos mediante la endocitosis, de esta forma llegan a la circulación linfática y a la sangre periférica, logrando así llegar a distintos tejidos, en donde la Lf interactúa con diversos receptores para realizar las diferentes acciones fisiológicas, un ejemplo de esta acción es dirigirse al bazo y poder aumentar las poblaciones de linfocitos CD4+, CD8+ y linfocitos B, como se ve en los resultados.

---

---

Un aspecto importante en la administración de la lactoferrina es que el efecto puede ser dosis dependiente, Dhennin-Duthille (38) en su estudio, observaron que la densidad de células que expresaban CD4 variaba conforme a la dosis de hLf con la que fueron incubadas, mostrando una mayor expresión en los cultivos incubados a una dosis de 10µg/ml que en los que tenían una dosis de 100µg/ml, ya que esta última dosis bloquea la expresión de CD4. A nivel intestinal esto ocurre de diferente manera, Fischer y colaboradores, observaron la absorción y distribución de la bLf de manera oral, determinando que al ser administrada diariamente, forma complejos inmunes de Lf- IgA e IgG, disminuyendo la absorción de esta, pero aun así llevándose a cabo su efecto fisiológico. El motivo de esta disminución de la absorción de la Lf aún no se tiene claro, pero una hipótesis sugiere que esto minimizaría una reacción dañina que se pueda dar entre las proteínas provenientes de la dieta y el sistema inmune, como por ejemplo una reacción de hipersensibilidad (42).

Con respecto a la dosis que se administra, la mayoría de los estudios en ratón se ha probado una dosis de 5mg, siendo una dosis mínima en la cual se puede observar un efecto inmunomodulador y antimicrobiano. En ensayos clínicos en humanos la dosis es muy variable, Manzoni uso un régimen de 100mg/día, y en otros ensayos se lleva una dosis conforme al peso del neonato que va desde 150 a 200mg/kg/día, debido a lo que se discutió anteriormente, una sobredosis de Lf es muy poco probable, haciendo el uso de la Lf una alternativa segura para promover la maduración, modulación y promoción del sistema inmune adaptativo (55).

Conforme a los resultados, el uso de la Lf, puede contribuir a la generación de la repuesto celular y humoral, sin que esta repuesta sea exacerbada sin provocar efectos dañinos en el paciente, debido a las vías de señalización que activa la Lf, se puede dar una rápida maduración de los linfocitos CD4+. Translocándolo a un escenario clínico, esto explicaría, que en los ensayos que se han llevado a cabo los neonatos pretérmino o de muy bajo peso, disminuye la incidencia de enterocolitis necrosante, sepsis neonatal. Ya que puede a acelerar el desarrollo de la respuesta adaptativa. La posibilidad de poder brindar un aporte de Lf independiente a la leche materna, puede ayudar, además de que posiblemente pueda atenuar los efectos secundarios de muchos de los medicamentos



---

---

que se utilizan en el neonato a temprana edad. Sin embargo, en el adulto, aún se requieren más estudios básicos sobre el efecto que pueda tener la Lf ya en un modelo de sepsis, ya que en la fase 3 del estudio clínico OASIS en el 2015 (60), los pacientes con sepsis tratados con TLf, aumento la mortalidad, las causas que hayan provocado este resultado no se conocen, pero se propuso que la administración oral en estos pacientes no es una ruta ideal (68). Pero ya se ha comprobado que la vía de administración oral es la que tiene mejor efecto ya que la Lf tienen la capacidad de absorberse por las células intestinales y comenzar diferentes vías de señalización, que provocan diferentes efectos a nivel intestinal y también sistémicos (9) (38) (40) (41)(43)(45)(58). Como se observa en nuestros resultados, la vía oral muestra tener efecto en la generación de la respuesta celular en el bazo a los pocos días de iniciar el tratamiento con bLf. En el reporte final de estudio OASIS, hacen mención que los pacientes con choque séptico no son los pacientes más ideales para poder usar el tratamiento con TLf, esto se puede deber a la gran disfunción por la que está pasando el cuerpo y que esto provoca un cambio desfavorable en el microambiente celular, impidiendo que se lleven de una forma eficiente las diferentes rutas de activación y señalización, sería interesante evaluar en un modelo de sepsis en ratón administrado con bLf, esta misma cinética para observar el comportamiento de la expresión de linfocitos T y B, además de observar cómo se modifican las citocinas proinflamatorias y de igual manera analizar las posibles vías de señalización que se activan,

## 7 Conclusiones

- El inicio de la respuesta celular se comienza desde el inicio de la administración de la bLf, como se había reportado anteriormente, promueve la maduración de linfocitos T CD4+, CD8+ y B.
- La promoción de las poblaciones de linfocitos, no se da de una manera creciente proporcional a los días de administración de la bLf, sino que se observan aumentos y decrementos, formando oleadas de la expresión de estas poblaciones.

- La generación de la respuesta humoral, comienza a darse a partir del día 7, posiblemente a la generación de los complejos inmunes que limitan la absorción de la bLf.
- Existe una mayor producción de IgM, siendo esta una de las principales inmunoglobulinas que actúa en la activación de los mecanismos de la respuesta innata.

## 8 Perspectivas

- Llevar a cabo el análisis del inicio de la respuesta celular en un modelo murino de ratones neonatos, para observar cómo es que es el inicio de la maduración de este tipo de respuesta adaptativa.
- Se podría llevar a cabo un análisis más profundo sobre las vías de señalización que se activan en células intestinales y como esta respuesta puede o no ser modificada en sepsis o en choque séptico.

## 9 Bibliografía

1. Pérez-Tamayo R. Ciencia básica y ciencia aplicada. Salud Publica Mex. 2001;43(4):368–72.
2. Vélez EV. Investigación en enfermería, fundamento de la disciplina. Rev Adm Sanit. 2009;7(2):341–56.
3. Cárnio EC. Las ciencias básicas y la enfermería Como citar este artículo : 2011;19(5).
4. Yeap SK, Binti M, Rahman A, Omar AR, Beh BK, Ky H. Evaluation of Immunomodulatory Effect : Selection of the Correct Targets for Immunostimulation Study Noorjahan Banu Alitheen , 2 Wan Yong Ho , Institute of Bioscience , Deptament of Cell and Molecular Biology , Deptatment of Bioprocess Technology , Facult. 2011;7(2):17–23.
5. Abood WN. Immunomodulatory and Natural Immunomodulators. iMedPub Journals. 2017;1(2):1–4.
6. Ward PP, Piddington CS, Cunningham GA, Zhou X, Wyatt RD, Conneely OM. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: A broad spectrum natural antibiotic. Bio/Technology. 1995;13(5):498–503.
7. Bennett RM, Kokocinski T. Lactoferrin Content of Peripheral Blood Cells. Br J Haematol.

- 1978;39(4):509–21.
8. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol.* 2006;84(3):282–90.
  9. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(22):2549–59.
  10. Karav S, German JB, Rouqui C, Parc A Le, Barile D. Studying Lactoferrin N - Glycosylation. 2017;1–14.
  11. Drago-serrano ME, Flores-romo L, Oliver-aguillón G, Jarillo-luna A, Reina-garfias H, Barbosa-cabrera E, et al. La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. 2008;(2):71–82.
  12. González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(4):301.e1-301.e8.
  13. Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H, et al. Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(8):2619–23.
  14. Van der Strate BWA, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DKF. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001;52(3):225–39.
  15. 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(2):106–13.
  16. Dzitko K, Dziadek B, Dziadek J, D??ugo??ska H. *Toxoplasma gondii*: Inhibition of the intracellular growth by human lactoferrin. *Polish J Microbiol.* 2007;56(1):25–32.
  17. Ikadai H, Tanaka T, Shibahara N, Tanaka H, Matsuu A, Kudo N, et al. Short report: Inhibitory effect of lactoferrin on in vitro growth of *Babesia caballi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(4):710–2.
  18. Wang WP, Iigo M, Sato J, Sekine K, Adachi I, Tsuda H. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Japanese J Cancer Res.* 2000;91(10):1022–7.
  19. Wolf JS, Li G, Varadhachary A, Petrak K, Schneyer M, Li D, et al. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res.* 2007;13(5):1601–10.
  20. Chen HL, Yen CC, Wang SM, Tsai TC, Lai ZL, Sun JY, et al. Aerosolized bovine lactoferrin reduces lung injury and fibrosis in mice exposed to hyperoxia. *BioMetals.* 2014;27(5):1057–68.
  21. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 9th Editio. United States of America: Elsevier; 2018. 579 p.
  22. Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th editio. United States of America: Garland Science; 2017. 924 p.
  23. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 13ra edici. España: Editoria Panamericana; 2006. 1340 p.

24. Parkin J, Cohen B. An Overview of the Immune System. *Lancet*. 2001;357:1777–89.
25. Takatsu K, Kariyone A. The immunogenic peptide for Th1 development. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(6):783–800.
26. Martinez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol* [Internet]. 2014;11(1):33–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
27. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).
28. Farreras P, Rozman C, Domarus A Von, Cardellach F. *Medicina Interna*. 18va Edici. Farreras Rozman-Medicina Interna. España: Elsevier; 2016. 2689 p.
29. Zapata JP. Sepsis: la otra cara de la respuesta inmune. *Iatreia* [Internet]. 2011;24(2):179–90. Available from: <papers2://publication/uuid/93ABCFF6-40BA-4DB1-9D42-B97650EFF93F>
30. Gómez-Gómez B, Sánchez-Luna JP, Pérez-Beltrán CF, Díaz-Greene EJ, Rodríguez-Weber FL. Choque séptico. Lo que sabíamos y lo que debemos saber... TT - Septic shock. What we knew and what we should know... *Med interna México* [Internet]. 2017;33(3):381–91. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-48662017000300381&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.mx/pdf/mim/v33n3/0186-4866-mim-33-03-00381.pdf](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-48662017000300381&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.mx/pdf/mim/v33n3/0186-4866-mim-33-03-00381.pdf)
31. Angus DC, van der Poll T. Sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840–51.
32. Singer M, Deutschman CS, Warren Seymour C, Shankar-Hari M. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–10.
33. Shane AL, Sanchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet*. 2017;6736(17):217–32.
34. Penagos M, Berrón R, García M de la L, Zaragoza JM. El sistema inmune de recién nacido. *Alergia, asma e Inmunol pediátricas* [Internet]. 2003;12(2):63–8. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2003/al032e.pdf>
35. Cérbulo-vázquez A, Ortiz-ibarra FJ. La respuesta inmune celular del neonato. 2000;14(2):88–97.
36. Ana Gabriela Herrera Aguirre D, Jazmín Rodríguez Tapia D, Suárez Aceves R, Manuel Hernández Bautista V. El sistema inmune neonatal y su relación con la infección. Artículo de revisión [Internet]. 2013;22:101–13. Available from: [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
37. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885–91.
38. Dhennin-Duthille I, Masson M, Damiens E, Fillebeen C, Spik G, Mazurier J. Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *J Cell Biochem*. 2000;79(4):583–93.
39. Zimecki M, Mazurier J, Spik G, Kapp JA. Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology*. 1995;86(1):122–7.
40. Sfeir RM, Dubarry M, Boyaka PN, Rautureau M, Tomé D. The Mode of Oral Bovine Lactoferrin Administration Influences Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice.

- J Nutr. 2004;134(2):403–9.
41. Fischer R, Debbabi H, Dubarry M, Boyaka P, Tomé D. Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin. This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 7th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function, and Applications, and h. *Biochem Cell Biol.* 2006;84(3):303–11.
  42. Fischer R, Debbabi H, Blais A, Dubarry M, Rautureau M, Boyaka PN, et al. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues. *Int Immunopharmacol.* 2007;7(10):1387–93.
  43. Zimecki M, Artym J, Chodaczek G, Kocieba M, Kruzel M. Effects of lactoferrin on the immune response modified by the immobilization stress. *Pharmacol Reports.* 2005;57(6):811–7.
  44. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145–51.
  45. Ando K, Hasegawa K, Shindo KI, Furusawa T, Fujino T, Kikugawa K, et al. Human lactoferrin activates NF- $\kappa$ B through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *FEBS J.* 2010;277(9):2051–66.
  46. Peña-Juárez MC, Campos-Rodríguez R, Godínez-Victoria M, Cruz-Hernández TR, Reyna-Garfias H, Barbosa-Cabrera RE, et al. Effect of Bovine Lactoferrin Treatment Followed by Acute Stress on the IgA-Response in Small Intestine of BALB/c Mice. *Immunol Invest.* 2016;45(7):652–67.
  47. Drago-Serrano ME, Rivera-Aguilar V, Reséndiz-Albor AA, Campos-Rodríguez R. Lactoferrin increases both resistance to *Salmonella typhimurium* infection and the production of antibodies in mice. *Immunol Lett.* 2010;134(1):35–46.
  48. Kang S-H, Jin B-R, Kim H-J, Seo G-Y, Jang Y-S, Kim S-J, et al. Lactoferrin Combined with Retinoic Acid Stimulates B1 Cells to Express IgA Isotype and Gut-homing Molecules. *Immune Netw.* 2015;15(1):37.
  49. Arciniega-Martínez IM, Campos-Rodríguez R, Drago-Serrano ME, Sánchez-Torres LE, Cruz-Hernández TR, Reséndiz-Albor AA. Modulatory Effects of Oral Bovine Lactoferrin on the IgA Response at Inductor and Effector Sites of Distal Small Intestine from BALB/c Mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016;64(1):57–63.
  50. Siqueiros-Cendón T, Arévalo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa BF, García-Montoya IA, Salazar-Martínez J, Rascón-Cruz Q. Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacol Sin [Internet].* 2014;35(5):557–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2013.200>
  51. Cabello CM, Bair WB, Lamore SD, Ley S, Alexandra S, Azimian S, et al. NIH Public Access. Vol. 46. 2010. 220–231 p.
  52. Donovan SM. The Role of Lactoferrin in Gastrointestinal and Immune Development and Function: A Preclinical Perspective. *J Pediatr [Internet].* 2016;173:S16–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.072>
  53. Neu Josef WWA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med.* 2011;653–9.
  54. Jin Y-T, Duan Y, Deng X-K, Lin J. Prevention of necrotizing enterocolitis in premature

- infants – an updated review. *World J Clin Pediatr.* 2019;8(2):23–32.
55. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pugni L, Romeo MG, Messner H. for Prevention of Late-Onset Sepsis in Very Low-Birth-Weight Neonates. *J Am Med Assoc [Internet].* 2009;302(13):1421–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2009.1403>
  56. Manzoni P, Meyer M, Stolfi I, Rinaldi M, Cattani S, Pugni L, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight neonates: A randomized clinical trial. *Early Hum Dev [Internet].* 2014;90(SUPPL.1):S60–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782\(14\)70020-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782(14)70020-9)
  57. Akin IM unga., Atasay B, Dogu F, Okulu E, Arsan S, Karatas HD, et al. Oral lactoferrin to prevent nosocomial sepsis and necrotizing enterocolitis of premature neonates and effect on T-regulatory cells. *Am J Perinatol.* 2014;31(12):1111–20.
  58. Jiang R, Du X, Lönnerdal B. Comparison of bioactivities of talactoferrin and lactoferrins from human and bovine milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59(5):642–52.
  59. Guntupalli K, Dean N, Morris PE, Bandi V, Margolis B, Rivers E, et al. A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of talactoferrin in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2013;41(3):706–16.
  60. Vincent JL, Marshall JC, Dellinger RP, Simonson SG, Guntupalli K, Levy MM, et al. Talactoferrin in Severe Sepsis: Results from the Phase II/III Oral tAlactoferrin in Severe sepsIS Trial. *Crit Care Med.* 2015;43(9):1832–8.
  61. Choi BK, Actor JK, Rios S, D’Anjou M, Stadheim TA, Warburton S, et al. Recombinant human lactoferrin expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*: Effect of terminal N-acetylneuraminic acid on in vitro secondary humoral immune response. *Glycoconj J.* 2008;25(6):581–93.
  62. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, Festing MFW, Cuthill IC, Fry D, et al. Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. *PLoS One.* 2009;4(11).
  63. Artym J, Zimecki M, Kruzel ML. Reconstitution of the cellular immune response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with renewal of T cell compartment. *Immunobiology.* 2003;207(3):197–205.
  64. Hellweg P, Krammer-lukas S, Strasser A. Archives of Animal Nutrition Effects of bovine lactoferrin on the immune system and the intestinal microflora of adult dogs. (January 2015):37–41.
  65. Iigo M, Kuhara T, Ushida Y, Sekine K, Moore MA, Tsuda H. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17(1):35–40.
  66. Miyauchi H, Kaino A, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H. Immunomodulatory Effect of Bovine Lactoferrin Pepsin Hydrolysate on Murine Splenocytes and Peyer ’ s Patch Cells. *J Dairy Sci [Internet].* 1997;80(10):2330–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76184-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76184-8)
  67. Van Veen HA, Geerts MEJ, Van Berkel PHC, Nuijens JH. The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur J Biochem.* 2004;271(4):678–84.

- 
- 
68. Martin L, van Meegern A, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial peptides in human sepsis. *Front Immunol.* 2015;6(JUL):1–7.