



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

***Evaluación de los efectos de la lactoferrina sobre las alteraciones  
producidas en modelos murinos de inflamación intestinal  
inducida por Dextrano Sulfato Sódico (DSS)***

**TESIS**

Para obtener el título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Presenta:

**Luis Ernesto Miranda Olmedo**

Asesor:

**M en C Hilda Laura Sandoval Rivera**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2023**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ASUNTO:  APROBATORIO

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VAQUERO RAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**Evaluación de los efectos de la lactoferrina sobre las alteraciones producidas en modelos murinos de inflamación intestinal inducida por Dextrano Sulfato Sódico (DSS)**

Que presenta el pasante: **Luis Ernesto Miranda Olmedo**.

Con número de cuenta: **309240277** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**




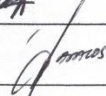
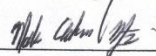
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de diciembre de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Hilda Laura Sandoval Rivera	
<b>SECRETARIO</b>	M.V.Z. Edna Maribel Legaspi Nuevo	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dr. Ismael Hernández Ávalos	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. Marcela Autran Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

MCVB/ntm\*

## **DEDICATORIA**

### **A Dios:**

*“Porque el Señor da la sabiduría; conocimiento y ciencia brotan de sus labios”*

*Proverbios 2;7.*

Por ser mi creador y mi padre a Él sea toda la gloria, honra y poder.

### **A mi esposa**

Con todo mi amor por ser mi ayuda idónea, mi amiga, mi compañera de estudio, por apoyarme en cada paso, creyendo que este es el inicio de muchos otros éxitos que compartiremos juntos.

### **A mi Madre:**

Por el amor, sacrificio, confianza y el tiempo invertido en mí, sin ella nada de esto hubiera sido posible, con mucho amor a ti, por creer en mí y apoyarme en todo momento con la firmeza que todo el esfuerzo daría frutos

### **A mi familia:**

Con mucho amor para todos, porque en todo momento me brindaron el apoyo necesario para terminar este sueño.

### **A mis amigos**

Por aquellas grandes aventuras, experiencias, enseñanzas, la confianza y el apoyo brindado en todo momento durante este sueño.

## AGRADECIMIENTOS

Al programa de apoyo a la titulación de egresados del área de la DGECI UNAM por darme la oportunidad de participar en el programa y el apoyo financiero brindado para realizar la estancia.

A la Facultad de Veterinaria de la UNIZAR y al Doctor Miguel Ángel por el apoyo en la estancia de investigación en la cual colaboré en el estudio del efecto de proteínas lácteas sobre la inflamación intestinal y las alteraciones motoras intestinales asociadas, empleando técnicas de motilidad *in vivo e in vitro*, perteneciente al proyecto de investigación AGL2017-82987-R concedido por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del Gobierno Español para los años 2018-2020.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
1. MARCO TEÓRICO	7
1.1 Aspectos morfo-fisiológicos del aparato digestivo.	7
1.1.2 Cavidad oral	7
1.1.2 Esófago y estómago	8
1.1.3 Intestino delgado	8
1.1.4 Intestino grueso	9
1.2 Histología del tubo digestivo	10
1.2.1 Mucosa	10
1.2.2 Submucosa	10
1.2.3 Muscular	10
1.2.4 Serosa	11
1.3 Fisiología de la motilidad intestinal	11
1.3.1 Electrofisiología del músculo liso gastrointestinal	12
1.3.2 Acoplamiento electromecánico	13
1.3.3 Regulación neuronal y hormonal de la motilidad intestinal	14
1.3.4 Reflejo Peristáltico	15
1.4 Enfermedad inflamatoria intestinal	17
1.5 Modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS	20
1.6 Lactoferrina	23
2.-HIPÓTESIS	25
3.- OBJETIVOS	25
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Físicos	26
4.2 Químicos	26
4.3 Biológicos	26
4.2 Administración de lactoferrina	28
4.3 Estudio del tránsito gastrointestinal <i>in vivo</i>	28

<b>4.4 Inducción de colitis mediante la administración de sulfato de dextrano sódico (DSS)</b>	<b>30</b>
<b>4.5 Parámetros tomados en cuenta para el score clínico</b>	<b>30</b>
<b>4.6 Sacrificio y obtención de muestras</b>	<b>31</b>
<b>5.- RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>6.-DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>7.- CONCLUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Contracción del músculo liso</i>	14
<i>Figura 2 Factores que juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias del intestino. DSS: sulfato de sodio de dextrano. (Derrick D)</i>	19
<i>Figura 3 Representación esquemática de la colitis inducida por DSS</i>	22
<i>Figura 4 Sistema de identificación utilizado en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón</i>	27
<i>Figura 5 Cronograma de actividades realizadas durante el ensayo.</i>	27
<i>Figura 6 Grupos del ensayo organizados e identificados con colores</i>	28
<i>Figura 7 Ratones separados individualmente durante el ensayo del tránsito intestinal in vivo.</i>	29
<i>Figura 8 Porcentajes de pérdida de peso durante el ensayo.</i>	34
<i>Figura 9 Evaluación clínica diaria durante el ensayo.</i>	35
<i>Figura 10 Resultados del examen macroscópico</i>	36
<i>Figura 11 Medición de la longitud del colon en los diferentes grupos experimentales</i>	38
<i>Figura 12 Comparativo del tránsito gastrointestinal</i>	39



## RESUMEN

La lactoferrina es una glicoproteína que pertenece a la familia de proteínas no hémicas fijadoras de hierro y se encuentra en la leche de numerosas especies de mamíferos, incluyendo el ser humano, se ha encontrado en otras secreciones externas, en neutrófilos, médula ósea y placenta. Estas proteínas tienen la capacidad de unir, de forma reversible, dos átomos de ión férrico en presencia de un ion bicarbonato o carbonato. La lactoferrina bovina es una proteína a la que se le han atribuido numerosas propiedades biológicas entre ellas, destaca su actividad antibacteriana, demostrada *in vitro e in vivo*. Este efecto puede ser bacteriostático, por su capacidad para quelar el ion férrico, necesario para el crecimiento bacteriano, o bactericida debido a la interacción entre la lactoferrina y la membrana bacteriana. Esta capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana celular puede facilitar el paso de otras sustancias antimicrobianas, como la lisozima o los antibióticos. El estudio fue realizado en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón, España. Durante el ensayo se siguieron los protocolos se llevaron a cabo en acuerdo con la directiva 2016/63EU de la Unión Europea relativa a la protección de los animales de experimentación. Durante el presente trabajo se realizó un protocolo para inducir enfermedad inflamatoria intestinal aguda con dextrano sulfato sódico(DSS) administrado en agua de bebida durante 5 días, formando un grupo control de lactoferrina y otro grupo control sin ningún tratamiento, el grupo experimental y uno control tratado con DSS para realizar las comparaciones y ver los impactos inflamatorios reales de la inducción, teniendo un total de 4 grupos, en condiciones igualitarias, realizando una valoración clínica de los animales que incluía: control del peso, consistencia de heces y pruebas de sangre oculta. El proceso de tránsito intestinal *in vivo* se realizó mediante la administración de una emulsión con colorante registrando el tiempo desde la administración hasta la primera excreción de heces coloreadas de azul, tras el sacrificio se valoró la longitud del colon como principal cambio patológico.

## INTRODUCCIÓN

El aparato digestivo contribuye con la homeostasis degradando los alimentos de manera que las células del cuerpo puedan absorberlos y utilizarlos. También absorbe agua, vitaminas, minerales y elimina desechos. Dentro de las funciones del aparato gastrointestinal está la de mezclar el alimento con las secreciones pancreáticas, biliares e intestinales por medio de la motilidad intestinal, transporta el contenido desde el duodeno a una velocidad adecuada para permitir la correcta absorción de nutrientes en la mucosa y su máximo aprovechamiento para posteriormente eliminar los restos de los alimentos y secreciones, este movimiento es también un mecanismo de defensa contra agentes patógenos que buscan colonizar el tracto intestinal. (Guyton, 2011)

Por todas estas funciones es importante que en todo momento tenga un funcionamiento óptimo y merece ser objeto de estudio y profundizar en la motilidad intestinal y los procesos por los cuáles se lleva a cabo el correcto funcionamiento, para así detectar anomalías y sustancias que provocan un aumento o disminución de esta motilidad. (Hechtman, 2014)

Los mecanismos implicados en la iniciación de la enfermedad inflamatoria intestinal no se conocen con exactitud, aunque se ha sugerido como principales componentes patológicos la susceptibilidad genética, el sistema inmunológico y el ambiente, principalmente la microbiota intestinal, el conocimiento adquirido a través de estos estudios experimentales ha permitido comprender aspectos relacionados con la aparición del brote inflamatorio y con el curso de la patología humana. Además, la mayoría de modelos experimentales de inflamación intestinal permiten hacer aproximaciones a nuevas estrategias terapéuticas en fase preclínica, estos modelos animales para el estudio se pueden clasificar en dos categorías: modelos inducidos y modelos espontáneos, a pesar de que hoy en día se dispone de modelos en ratas y ratones que pueden sobre expresar o silenciar una proteína concreta, el modelo de inducción con polisacáridos sulfatados ha sido utilizado desde la década de los 80, pero actualmente continúa siendo de los más utilizados dada la semejanza a la

fisiopatología de la enfermedad intestinal y se puede adaptar si se requiere una presentación aguda o crónica. (Cerar, 2012)

Las lactoferrinas humana y bovina, despliegan un amplio espectro antimicrobiano, actuando contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y contra algunos virus y hongos. Inicialmente se pensó que esta actividad antimicrobiana se debía únicamente a su capacidad de secuestrar hierro. En la actualidad, se sabe que existen diversos mecanismos que contribuyen a la capacidad de esta glicoproteína, para defender a los mamíferos de las infecciones microbianas, es por eso que se ha profundizado al estudio de esta proteína por la relación que podría tener con la actividad inmunológica en el epitelio intestinal ya que se encuentra en la mucosa y participa en diversos procesos inmunológicos dentro del aparato gastrointestinal. (Franco., et. al. 2005, Almero, 2007).

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Aspectos morfo-fisiológicos del aparato digestivo.

Presenta organizaciones muy diversas tanto en los animales invertebrados como en los vertebrados. Sin embargo, el aparato digestivo de los vertebrados es, en general, un tubo hueco que recorre el organismo en dirección longitudinal, abierto en sus extremos, la boca y el ano. Aunque hay profundas diferencias dependiendo del tipo de dieta que tienen los diferentes grupos de animales, no solo morfológicas sino también fisiológicas, se analizará la estructura general refiriéndonos principalmente a los mamíferos de dieta omnívora.

El tubo digestivo se subdivide en 4 partes:

- 1) Cavidad de la boca y faringe
- 2) Esófago y estómago
- 3) Intestino:
  - Intestino delgado
  - Intestino grueso
- 4) Canal anal (Megías, *et.al*; 2019)

### 1.1.2 Cavidad oral

La boca es la primer parte del aparato digestivo, está limitada lateralmente por los carrillos, dorsalmente por el paladar y ventralmente por el cuerpo de la mandíbula y el milohioideo y caudalmente por el paladar blando; la entrada a la boca está protegida por los labios (Sisson y Grossman, 1982).

La faringe está ubicada en el sitio de unión de los tractos respiratorio y digestivo, ventralmente al paladar se encuentra la parte digestiva de la faringe, formando el orificio intrafaríngeo, esta parte ventral se divide en 3 segmentos:

- Orofaringe
- Laringofaringe

- Parte esofágica de la faringe, denominada así porque desemboca en el esófago.

### **1.1.2 Esófago y estómago**

El esófago es la continuación de la vía digestiva desde la faringe hacia el estómago, se inicia en el cartílago cricoides de la laringe, discurre dorsalmente a la tráquea, en el tórax el esófago se ubica en el plano mediano en el espacio mediastínico y atraviesa la bifurcación de la tráquea y la base del corazón. De acuerdo a su posición, el esófago se subdivide en una parte cervical, una parte torácica y una parte corta abdominal atravesando el diafragma a través del hiato esofágico.

El estómago está situado entre el esófago y el duodeno, representa una porción dilatada del tubo digestivo, se diferencia en los mamíferos por su forma, posición y la distribución de los tipos de revestimiento interior (mucosa) clasificándolos como simples o compuestos. Su luz está cerrada por el cardias ubicado más hacia la izquierda y en la salida por el píloro compuesto por músculos esfínteres, en una posición hacia la derecha continuando con el duodeno.

En el estómago se distinguen diferentes regiones:

- Cuerpo
- Fondo
- Saco ciego
- Curvatura mayor
- Curvatura menor (Akers, 2008)

### **1.1.3 Intestino delgado**

El intestino delgado (ID) es un tubo muscular que inicia en el esfínter pilórico y finaliza en el intestino grueso. Se sitúa en la cavidad abdominal, suspendido en forma de abanico entre la pared abdominal posterior y el mesenterio. Se divide en tres secciones:

- Duodeno. Primera parte del ID y la más corta; mide unos 25 centímetros. Inicia en el esfínter pilórico y finaliza en el ángulo duodeno-yeyunal. En él desembocan los conductos pancreático y biliar para la secreción de enzimas y bilis.
- Yeyuno. Es la segunda sección del intestino, y mide aproximadamente 2,5 metros. Empieza en el ángulo duodeno-yeyunal y tiene la capacidad de modificar su morfología a lo largo del tramo y finaliza en el íleon.
- Íleon. Es la última parte del intestino delgado y con mayor longitud, unos 3,5 metros. Finaliza en la válvula ileocecal, es decir, la zona que une el íleon distal con el ciego.

El intestino delgado es el lugar donde se inicia verdaderamente la digestión química de los alimentos con la llegada del quimo desde el estómago. La regulación del paso del quimo del estómago al duodeno es compleja y en ella intervienen reflejos nerviosos y factores hormonales que van a permitir ese paso de alimento en función de su composición y en función de que el duodeno sea capaz de manipular pequeñas cantidades de alimento.

#### **1.1.4 Intestino grueso**

El intestino grueso se divide a su vez en ciego, colon y recto. El colon posee una parte ascendente, una transversa, y una descendente, además del colon sigmoide. El intestino grueso se conecta al intestino delgado mediante la válvula o esfínter íleo-cecal. El ciego posee una ramificación muy delgada llamada apéndice, de unos 5 a 13 cm de longitud, donde se acumulan muchos linfonodos. El recto se comunica con el exterior a través del ano. La zona donde el intestino grueso se une a la piel del ano se denomina unión ano-rectal. Aquí se produce la transición desde epitelio simple prismático a epitelio estratificado plano queratinizado, típico de la epidermis. A este nivel existe un engrosamiento de la musculatura externa que forma el esfínter

anal interno. También hay un esfínter externo formado por musculatura estriada. (Willey, 2009).

## **1.2 Histología del tubo digestivo**

La histología es la composición de los tejidos a nivel microscópico y el tracto gastrointestinal se caracteriza por la presencia de 4 capas distintas entre cada una de ellas, sin embargo, pequeños cambios en las diferentes porciones desde el esófago, estómago e intestinos, estas son mucosa, submucosa, muscular y serosa, desde el interior al exterior. (Megías., *et, al.* 2019).

### **1.2.1 Mucosa**

Es la capa más interna, está integrada por un epitelio columnar conformado dependiendo de la porción del tubo digestivo manteniendo la función de los procesos de absorción y secreción, la siguiente porción de la mucosa es la lámina propia, la cual le brinda soporte ya que es rica en fibras de colágeno y por último una pequeña capa muscular llamada muscular de la mucosa conformada por una delgada capa de células musculares lisas. (Megías., *et, al.* 2019).

### **1.2.2 Submucosa**

La submucosa es la capa que une la mucosa con la capa muscular y su principal función es recibir las moléculas absorbidas por la mucosa, filtrando con su gran cantidad de capilares sanguíneos y vasos linfáticos, además se encuentra el plexo submucoso que es una red neuronal muy importante para el funcionamiento del epitelio y una pequeña cantidad de glándulas. (Megías., *et, al.* 2019).

### **1.2.3 Muscular**

En las porciones de boca, faringe y esófago superior la capa muscular está compuesta por músculo esquelético que produce una deglución voluntaria y este tipo de músculo se encuentra también en la porción final del tracto formando parte del esfínter anal externo, lo cual permite el control voluntario de la defecación. El resto del tubo digestivo está conformado por músculo liso generalmente dispuesto en 2 capas, una interna con fibras musculares circulares y la externa con fibras musculares longitudinales, los cuales son mediados por el sistema nervioso

autónomo y otras sustancias como hormonas y mediadores químicos, lo que permite que presente una contracción involuntaria y así contribuye a degradar los alimentos, mezclarlos y propulsarlos a lo largo del tracto. Entre las 2 capas musculares está presente un plexo neuronal llamado: plexo mientérico. (Megías., et, al. 2019).

#### **1.2.4 Serosa**

Esta última capa es una membrana compuesta por tejido areolar y un epitelio simple (mesotelio) algunos autores llaman esta membrana como peritoneo visceral ya que forma parte de una porción del peritoneo que está presente en todo el tracto gastrointestinal a partir del estómago (Megías., et, al. 2019).

### **1.3 Fisiología de la motilidad intestinal**

La motilidad gastrointestinal es una función esencial para los procesos de digestión y de absorción de nutrientes y para la propulsión del contenido del intestino, mezclándolo de esta manera con los jugos digestivos y preparando las partículas no absorbidas para su excreción. A lo largo de todo el tracto gastrointestinal, la capa muscular está formada por células musculares lisas. Al igual que ocurre en el músculo estriado, las contracciones del músculo liso son inducidas por cambios en el potencial de membrana de sus células. A diferencia de las células musculares estriadas, las células musculares lisas no tienen sarcómeros bien organizados, son más pequeñas y están estructuradas en haces rodeados por tejido conectivo. Cada haz de células musculares lisas funciona como una sola unidad, es decir, como un sincitio. Todas las células del haz se contraen a la vez para producir una respuesta motora coordinada y eficiente. Esto es posible por la existencia de uniones en hendidura (de tipo gap) entre las células de cada haz. Estas uniones son zonas de baja resistencia eléctrica por donde puede propagarse instantáneamente una señal de despolarización.

El músculo liso del tracto gastrointestinal está organizado en dos capas: una capa interna, de mayor grosor, formada por fibras musculares lisas dispuestas circularmente, produciendo por tanto contracciones anulares, y una capa externa de fibras musculares lisas longitudinales, organizadas de manera que su eje corre a lo



largo de la luz del intestino. La contracción y la relajación de la capa muscular longitudinal provocan cambios en la longitud del intestino, lo que da lugar a la peristalsis. (Guyton, 2011; Hechtman, 2014).

### **1.3.1 Electrofisiología del músculo liso gastrointestinal**

En las células del músculo liso gastrointestinal podemos encontrar dos tipos de actividad eléctrica: ondas lentas, que contribuyen al denominado ritmo eléctrico básico, y potenciales de acción. A lo largo de todo el músculo del tracto gastrointestinal se dan fluctuaciones espontáneas rítmicas en el potencial de membrana en reposo de las células musculares lisas que lo forman. Estas fluctuaciones son conocidas como ondas lentas y causan ciclos repetitivos de despolarización y repolarización en las células musculares lisas: esto es el ritmo eléctrico básico. Sin embargo, las despolarizaciones causadas por las ondas lentas no son capaces por sí solas de provocar contracción muscular. El origen del ritmo eléctrico básico del intestino se encuentra en las células intersticiales de Cajal (ICCs) o células marcapasos. Se encuentran a lo largo de todo el tracto gastrointestinal y son las responsables de dictar el ritmo eléctrico básico, que determinará cuando se contrae cada parte del intestino. Esto es posible porque las ICCs forman uniones gap con las células musculares lisas, y de esta manera les transmiten las ondas lentas de despolarización y repolarización ya mencionadas. Aunque en la actualidad no está del todo claro, se cree que el origen de las ondas lentas en las ICCs se encuentra en la apertura espontánea de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana, lo que causa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula y la consiguiente despolarización. A continuación, se da la apertura de canales de  $\text{K}^{+}$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ : cuando aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, estos canales de  $\text{K}^{+}$  se activan, provocando la repolarización de la célula (Hall and Guyton, 2011; Sanders et al., 2012; Hechtman, 2014; Sanders, Ward and Koh, 2014).

Sin embargo, las ondas lentas de despolarización originadas por las ICCs no son capaces por sí solas de provocar la contracción de las células musculares lisas. Para ello es necesario un estímulo adicional que genere un potencial de acción “en

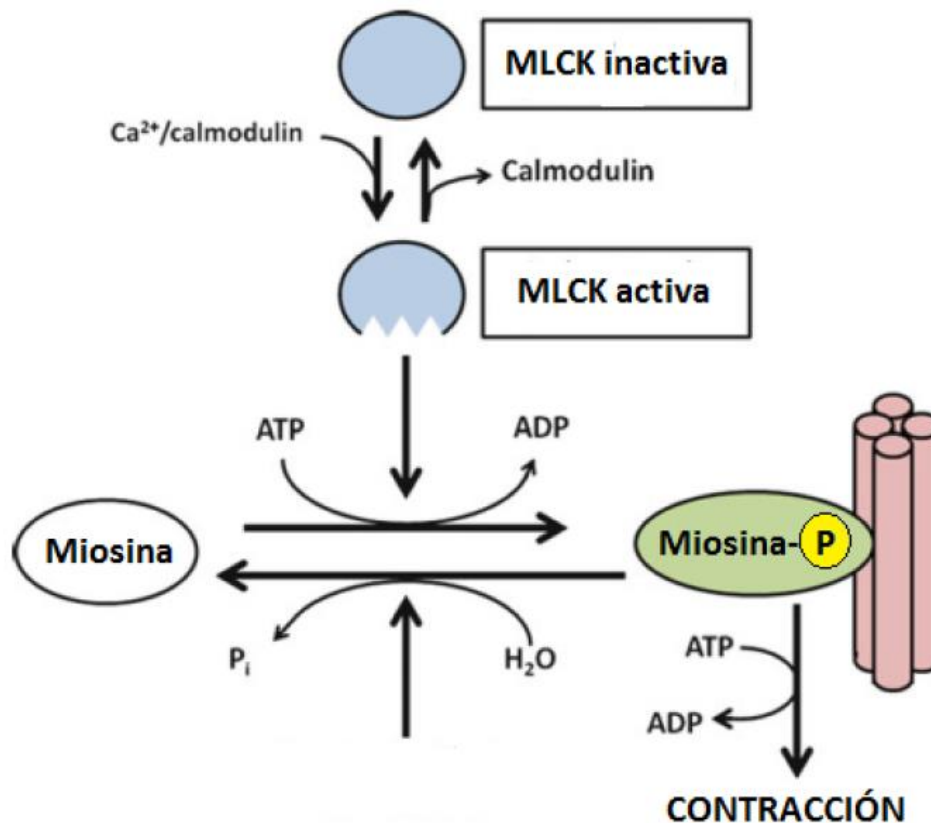
espiga”, que es el verdadero responsable de inducir la contracción del músculo liso. Este estímulo puede ser el estiramiento, que es capaz de provocar la aparición de los potenciales de acción en espiga, o la acción de diversas hormonas y neurotransmisores como la sustancia P (SP) o la acetilcolina (ACh). La función de las ondas lentas es, por tanto, acercar el potencial de membrana de la célula muscular lisa al potencial umbral necesario para que se dé el potencial de acción en espiga cuando aparezca el estímulo adecuado. De esta manera se coordinan las contracciones de todo un haz de células musculares, pues solo se pueden generar potenciales de acción en espiga en la fase de despolarización de las ondas lentas (Hall and Guyton, 2011; Sanders et al., 2012; Hechtman, 2014; Sanders, Kito and Hwang, 2016).

En definitiva, cuando se genera un potencial de acción en espiga en la célula muscular lisa, se produce la despolarización de la membrana de la misma y la consecuente activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L.

### **1.3.2 Acoplamiento electromecánico**

La aparición de una concentración elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) hace que este  $\text{Ca}^{2+}$  se una a la proteína calmodulina, formándose un complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina que es capaz de activar a la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). La MLCK estimula la fosforilación de la miosina, un paso clave en la iniciación de la de la interacción actina-miosina, responsable de la contracción de la célula muscular lisa (Figura 1) (Hall and Guyton, 2011; Sanders et al., 2012., Hechtman, 2014).

Figura 1 Contracción del músculo liso



### 1.1.3 Regulación neuronal y hormonal de la motilidad intestinal

La contracción del músculo liso gastrointestinal y por tanto la motilidad intestinal está regulada por el balance contrapuesto de agentes reguladores excitadores, que inducen la contracción, y agentes reguladores inhibidores. Algunos neurotransmisores y hormonas ejercen su acción directamente sobre las células del músculo liso gastrointestinal, como por ejemplo la acetilcolina (ACh), las taquiquininas (como la SP), las prostaglandinas (como la PGE<sub>2</sub>), la serotonina (5-HT), los péptidos opioides. Los agentes excitadores actúan en su mayor parte aumentando la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Por ejemplo, la ACh actúa sobre los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> (Receptores acoplados a Proteínas G $\alpha$ q/11), activando a la fosfolipasa C  $\beta$  y provocando la consecuente generación de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). El IP<sub>3</sub> actúa sobre sus receptores en el retículo endoplasmático, que a su vez son canales de

$\text{Ca}^{2+}$ , y por tanto induce un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, provocando la contracción de las células musculares lisas. (Akbarali, 2005; Gerthoffer, 2005; Sanders et al., 2012) Esta no es la única vía por la cual neurotransmisores como la ACh inducen la contracción del músculo liso, ya que la fuerza de contracción de las células musculares lisas no depende únicamente de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  es la fuerza de contracción de una célula a una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  determinada. Moléculas como la ACh, entre otras, pueden regular la sensibilidad de la célula al  $\text{Ca}^{2+}$  cuando actúa sobre sus receptores acoplados a proteínas G, al activar una serie de cascadas de señalización intracelulares que, a través de la acción de una serie de proteínas (Proteína Quinasa C, Rho quinasa, CPI-17...) acaban induciendo la inactivación de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), proteína responsable de inactivar la cadena ligera de la miosina y por tanto provocar de la relajación del músculo liso. De esta manera, este tipo de sustancias pueden aumentar en gran medida la fuerza de la contracción sin que varíe la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Otras moléculas como la SP, las prostaglandinas y la 5-HT funcionan de manera análoga a la ACh, al menos a la hora de excitar la contracción muscular: actúan sobre sus propios receptores, que son todos receptores acoplados a proteínas G de tipo  $\text{G}\alpha_q/11$  del mismo tipo que los receptores muscarínicos M3 (Akbarali, 2005; Gerthoffer, 2005; Sanders et al., 2012).

Por otro lado, los agentes inhibidores de la contracción muscular actúan mediante la estimulación del aumento de la concentración intracelular de cAMP o cGMP. Estos mensajeros secundarios activan a quinasas dependientes de cAMP o cGMP que son capaces de inhibir la formación de IP<sub>3</sub>, disminuyendo de esta manera el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica inducido por esta molécula y provocando la relajación del músculo liso gastrointestinal. Ejemplos de agentes inhibidores son el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el glucagón y el óxido nítrico (NO) (Hall and Guyton, 2011; Hechtman, 2014).

#### **1.3.4 Reflejo Peristáltico**

Las funciones de absorción y digestión del tracto gastrointestinal dependen de diversos patrones de motilidad característicos que se dan a lo largo de todo el

intestino. Las neuronas que liberan los agentes excitadores e inhibidores descritos en el apartado anterior son las responsables de regular y coordinar estos complejos patrones de contracción. La motilidad intestinal es un proceso que se encuentra regulado a múltiples niveles: las células musculares lisas reciben inervación del sistema nervioso entérico (SNE) y del sistema nervioso autónomo, simpático y parasimpático. Las neuronas del SNE, que se encuentran organizadas en los plexos de Meissner y de Auerbach, son las responsables de liberar neurotransmisores como el VIP, el NO, la SP, la neuroquinina A, entre otros, siendo los responsables de regular la motilidad intestinal y cuyo modo de acción hemos descrito en el apartado 1.1.3.

El reflejo peristáltico es un tipo de patrón de motilidad encargado de la propulsión del contenido del intestino en dirección aboral. Su funcionamiento es el siguiente: el aumento de la presión intramural producida por el contenido del lumen del intestino es captada por baroreceptores y causa la activación de un circuito neuronal. Este activa al mismo tiempo neuronas inhibitoras que inducirán la relajación del músculo liso gastrointestinal situado aboralmente al segmento en el que se detectó la presión, y a neuronas excitadoras que estimularán la contracción del músculo liso en la parte oral, provocando de esta manera el avance del contenido del intestino en dirección hacia el ano (Hall and Guyton, 2011; Hechtman, 2014).

## **12.5 Actividad inmune del aparato digestivo**

La mucosa intestinal tiene la difícil tarea de limitar la respuesta inflamatoria contra la microbiota y de mantener la habilidad de generar una respuesta inmunitaria contra los microorganismos patógenos. Esto crea una relación de equilibrio dinámico y frágil, entre el sistema inmunitario, la microbiota y la mucosa intestinal. Por este motivo, al alterarse cualquiera de ellos, puede generarse un proceso inflamatorio agudo o crónico. El sistema inmunitario innato de la mucosa intestinal, a través de un conjunto de receptores, células y mediadores, es capaz de censar, procesar y generar una respuesta inflamatoria o de inmunotolerancia. (Beutler 2014, Medzhitov et al. 2000)

Para esto cuenta con un componente celular, en el que destacan, entre otras, las células dendríticas, los macrófagos, los enterocitos, las células M y las células B, que constantemente censan el medio utilizando receptores de inmunidad innata; y ante una señal de peligro generarán una respuesta inflamatoria; o si el microambiente no presenta alteración significativa, crearán señales de inmunotolerancia (Kapsenberg, 2003, Smythies, et.al. 2005)

#### **1.4 Enfermedad inflamatoria intestinal**

La colitis ulcerosa (CU) forma parte del conjunto de entidades clínicas englobadas bajo la denominación de enfermedad inflamatoria intestinal (EII). La CU afecta al recto y al colon y se caracteriza por presentar continuas recidivas y remisiones. La incidencia de la colitis ulcerosa varía entre 0.5 y 31.5 de cada 100.000 personas cada año dependiendo del país, siendo significativamente mayor en países del primer mundo. El síntoma característico de esta enfermedad es la presencia de sangre en heces, debido a la aparición de úlceras en el intestino (Da Silva *et al.*, 2014)

La etiología de la enfermedad aún no es conocida con exactitud, aunque en la actualidad existen evidencias de que la EII, que engloba a colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, se debe a una activación continua e inapropiada del sistema inmune de la mucosa debido a su contacto con la microbiota intestinal.

A diferencia de la enfermedad de Crohn, la CU afecta principalmente al intestino grueso. Según la porción del intestino que se encuentre afectada, se pueden definir tres tipos de CU (Podolsky, 2002):

1. Proctitis: Solo está afectado el recto
2. Colitis distal: Está afectada la parte izquierda del colon.
3. Pancolitis: Está afectado la totalidad del colon.

La etiología de la CU se puede explicar por el efecto conjunto de factores genéticos, ambientales y autoinmunes, que desembocan en una activación sostenida del sistema inmune de la mucosa (Podolsky, 2002).

Esta respuesta inmunológica anormal puede deberse a defectos en la funcionalidad y la estructura de la barrera epitelial intestinal o a fallos en el sistema inmunitario de la mucosa (Schmitz *et al.*, 1999).

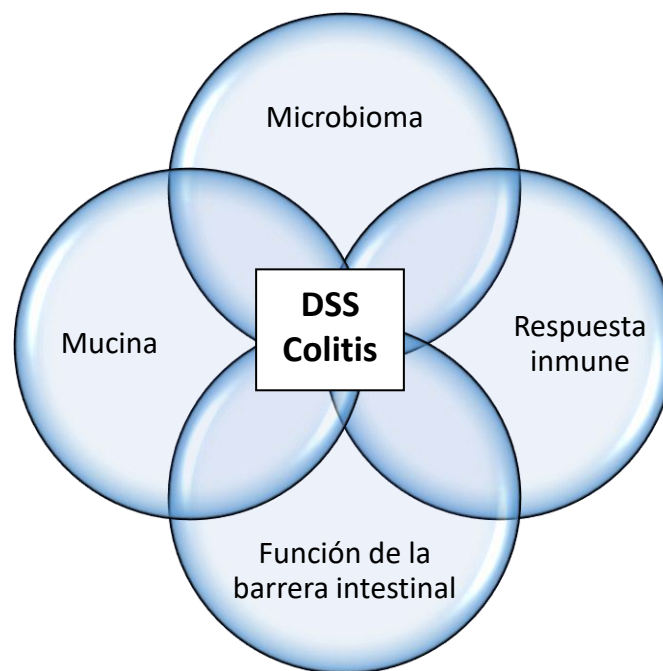
1. Defectos genéticos que afectan la función o estructura de la barrera epitelial intestinal: en genes responsables de la producción de péptidos antimicrobianos, en el mecanismo de la autofagia, en genes de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.
2. Fallos totales o parciales en mecanismos reparadores de la barrera epitelial intestinal de respuesta a lesiones.
3. Factores ambientales: microbiota, dieta, infecciones, estrés, antiinflamatorios no esteroideos, tabaco, antibióticos son algunos ejemplos.

La estimulación de la respuesta inmune de la mucosa se debe a la penetración de bacterias por la barrera epitelial dañada, causando su interacción con las células del sistema inmune presentes en la mucosa como linfocitos, células dendríticas o macrófagos, activando una respuesta inmune adaptativa clásica y provocando la inflamación intestinal crónica que no se resuelve con el tiempo, característica de esta enfermedad y causante de sus síntomas (Adams, 2007; Podolsky., 2007).

Otra posibilidad que se plantea es la existencia de defectos en el sistema inmunitario. Estos defectos pueden causar un ataque por parte del sistema inmune a sustancias no dañinas, como la comida, bacterias comensales o incluso el propio tejido intestinal. Todo ello provocaría daños en el epitelio intestinal, lo que causaría la entrada de bacterias comensales y contenido intestinal a la submucosa, generando un ciclo de retroalimentación positiva del sistema inmune (Jurenka., 2003; Adams, 2007). Estos fallos pueden ser defectos en mecanismos inmunitarios reguladores responsables de mantener un ambiente inmunosupresor en la mucosa intestinal, con el objetivo de evitar una respuesta exacerbada contra antígenos lumbinales a los que el sistema inmune de la mucosa intestinal está expuesto continuamente, como microorganismos de la microbiota o la comida. Si estos mecanismos reguladores fallan, aparecerá una respuesta inmune exacerbada

contra los elementos mencionados, dañándose la barrera epitelial en el proceso y causando la consiguiente inflamación crónica (Xavier, Podolsky y Podolsky, 2007; Neurath, 2014).

En cualquiera de estos casos, la consecuencia última es la sobreactivación de diferentes poblaciones de células del sistema inmune de la mucosa intestinal y la consecuente liberación de citoquinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), IL-6, el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que serán las causantes de la inflamación intestinal. La inflamación generará los síntomas característicos de esta enfermedad como úlceras, sangrado y dismotilidad (Adams, 2007; Xavier, Podolsky y Podolsky, 2007).



*Figura 2 Factores que juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias del intestino. DSS: sulfato de sodio de dextrano. (Derrick D)*

Por tanto, como se aprecia en la (figura 2) no se podría afirmar que esta enfermedad sea totalmente autoinmune o que tenga un origen únicamente genético, ya que parece haber factores ambientales implicados, entre los que destaca el papel del microbiota intestinal, la dieta, estrés, estado fisiológico e inmunitario, entre otros. La



dificultad para desentrañar con exactitud los mecanismos moleculares causantes de esta enfermedad estriba en esta gran cantidad de factores posiblemente implicados (Podolsky, 2007).

### **1.5 Modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS**

Debido a la compleja etiología de la EII existen múltiples tipos de modelos de ratones para su estudio. Se pueden dividir en varios grupos: colitis inducida químicamente, modelos inmunológicos, modelos en los que la enfermedad está inducida por bacterias y modelos transgénicos (knock-in y knock-out) (Cerar, 2012).

Dentro de los modelos de colitis inducida químicamente se destaca la utilización del Dextrán sulfato de sodio (DSS). La colitis inducida por DSS es uno de los modelos más usados debido a la simplicidad del protocolo de preparación y a las grandes semejanzas con la colitis ulcerosa que afecta al ser humano (Cerar, 2012).

La utilización de DSS para generar modelos de colitis ulcerosa en ratones data de 1990 y hoy en día es el más utilizado y conocido. La colitis es inducida añadiendo DSS al agua de bebida, y variando características como la concentración de DSS, la duración y la frecuencia de administración se puede provocar tanto colitis aguda como colitis crónica, convirtiéndolo en un modelo muy versátil (Randhawa *et al.*, 2014).

El DSS es un polisacárido sulfatado con un peso molecular muy variable, que puede ir desde 5 kDa hasta 1,400 kDa. El peso molecular del DSS es un factor a tener en cuenta en la inducción de la colitis, ya que la severidad de la enfermedad varía con el peso molecular del DSS utilizado, siendo más elevada cuanto mayor sea éste. Por ejemplo, se utiliza DSS de bajo peso molecular para inducir colitis moderada y de alto peso para colitis severa (Randhawa *et al.*, 2014).

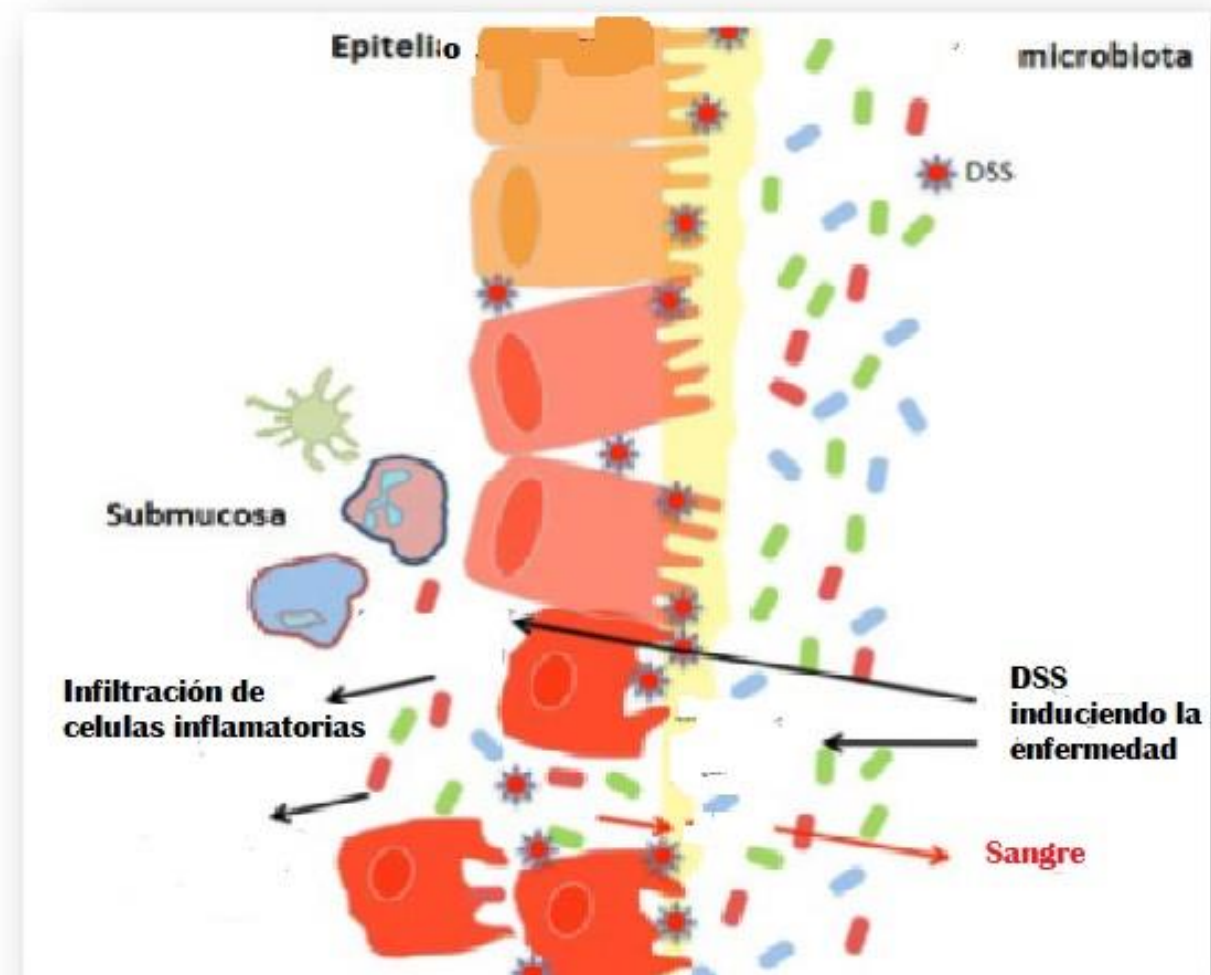
Las características clínicas e histológicas de la colitis inducida por DSS reflejan, en parte, y teniendo en cuenta las limitaciones que presenta el uso de un modelo animal, las observadas en la EII humana. La colitis aguda es inducida mediante la administración continua de DSS al 2 - 5% (p/v) durante 4 a 9 días. Las

manifestaciones clínicas que se pueden observar durante la inducción de la colitis aguda mediante DSS son: pérdida de peso, diarrea, sangre oculta en heces, anemia y piloerección (Cerar, 2012). En la práctica, para llevar a cabo un seguimiento de la colitis, se lleva a cabo un control diario del peso, la consistencia de las heces y de la presencia de sangre oculta en ella (Chassaing, Aitken, 2013). Una gran ventaja de la utilización del DSS para inducir colitis es que es un modelo muy estudiado y los protocolos y seguimientos a realizar se encuentran muy establecidos.

Los cambios histológicos que se observan típicamente en la colitis inducida por DSS incluyen: depleción de mucina, erosión y ulceración del epitelio intestinal y finalmente necrosis que termina en la desaparición de células epiteliales. Estos eventos vienen acompañados por la infiltración de neutrófilos en la lámina propia y la submucosa. (Cerar, 2012; Chassaing *et al.* 2013).

El DSS es tóxico para las células del epitelio intestinal del colon y provoca erosiones que acaban comprometiendo la integridad de la barrera intestinal, lo que resulta en el aumento de la permeabilidad del colon (Figura 3). Adicionalmente, las propiedades anticoagulantes del DSS agravan el sangrado intestinal (Chassaing *et al.* 2013). El mecanismo por el cual el DSS provoca daños en el epitelio intestinal es relativamente desconocido, pero recientemente se ha propuesto que el DSS daña al epitelio intestinal del colon mediante la formación de nanolipocomplejos con ácidos grasos (Laroui *et al.* 2014). Existen, sin embargo, varios estudios que demuestran que la actividad del DSS no se limita al colon, sino que también afecta al intestino delgado, y en especial al íleon (Yazbeck *et al.* 2011; Randhawa *et al.* 2014; Geier *et al.* 2009; Ohtsuka & Sanderson 2003)

Figura 3 Representación esquemática de la colitis inducida por DSS



El DSS provoca cambios en la expresión de proteínas como la zónula *occludens* 1 (ZO-1) y las claudinas -1,-3,-4 y -5, pertenecientes al complejo de proteínas que forman las uniones ocluyentes entre células del epitelio intestinal. Se ha comprobado que la pérdida de estas proteínas causa un aumento radical de la permeabilidad del epitelio intestinal, apareciendo antes que los signos clínicos de inflamación. Esto indica que, en este modelo, el daño al epitelio intestinal es el desencadenante de la respuesta inflamatoria (Poritz *et al.*, 2007), algo que no está del todo claro en la EII humana. Sin embargo, también se han encontrado alteraciones en la expresión de proteínas de las uniones ocluyentes en la EII humana (Cerar, 2012). La disrupción de la barrera epitelial permite la entrada de diversos antígenos lumenales y de microorganismos en la capa interna de la mucosa

intestinal. Esto provoca una respuesta inmune exagerada ante esos antígenos con los que normalmente no entra en contacto, lo que se puede observar en el aumento en la expresión de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores de inflamación (Yan et al. 2009; Cerar 2012).

Hasta el momento, se han implicado numerosos mediadores de inflamación en la EII humana, incluyendo eicosanoides, citoquinas, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico: De manera similar, la colitis inducida por DSS se encuentra asociada con la sobreexpresión de numerosos mediadores de inflamación. En concreto se ha descrito un aumento en la expresión las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12 desde el primer día de administración de DSS (Cerar, 2012). Otros autores afirman que la colitis aguda se caracteriza por el aumento en la expresión de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17 y que progresa a un perfil de tipo Th2 (IL-4, IL-10) conforme la enfermedad se cronifica (Alex et al. 2009; Alkahtani., et al. 2013).

## **1.6 Lactoferrina**

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de 80 KDa, producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos. Pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, denominadas transferrinas. La Lf presenta una alta homología entre especies, localizándose en secreciones mucosas como lágrimas, saliva, fluidos seminales y vaginales. Sin embargo, es en la leche y particularmente en su calostro, donde se encuentra en mayor concentración (7 g/L en calostro humano). La lactoferrina se encuentra también en los neutrófilos y en pequeñas cantidades en el plasma sanguíneo (0.2  $\mu$ g/L).<sup>10</sup> Se piensa que la Lf plasmática tiene dos orígenes, el primero es la liberación por parte de los neutrófilos, en respuesta al ataque microbiano.

La molécula de Lf está integrada por una cadena polipeptídica simple, plegada en dos lóbulos globulares simétricos (lóbulos N y C) conectados por una región bisagra. Cada lóbulo es capaz de unir un átomo de Fe<sup>+2</sup> o Fe<sup>+3</sup>, aunque también puede unirse a iones Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> y Mn<sup>+2</sup>. Esta glicoproteína presenta una carga neta positiva con un punto isoeléctrico (pI), entre 8.0 y 8.5 y 4 sitios potenciales de N-

glicosilación. Muchos científicos han estado intrigados sobre la función de la lactoferrina, desde su descubrimiento en las leches bovina, y humana. Inicialmente se pensó que actuaba únicamente como transportador de metales esenciales en el recién nacido. Posteriormente se comprobó que la Lf es un componente importante del sistema inmune innato, que exhibe propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antivirales, entre otras.

## 2.-HIPÓTESIS

- Al administrar lactoferrina vía oral a ratones inducidos con enfermedad inflamatoria intestinal provocará una disminución en la aparición de los signos clínicos.

## 3.- OBJETIVOS

- **General:** Evaluar el efecto de la lactoferrina en la motilidad intestinal y la inflamación provocada por la administración de Dextrano Sulfato Sódico (DSS).
- **Particulares:**
  - ❖ Utilizar el modelo de inflamación intestinal inducido por el Dextrano Sulfato Sódico (DSS)
  - ❖ Realizar estudios de motilidad *in vivo* de tránsito gastrointestinal
  - ❖ Realizar una valoración clínica diaria y tras el sacrificio valorar macroscópicamente el impacto inflamatorio en el colon.

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Físicos

- Los animales utilizados fueron alojados durante todo el estudio en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).
- 4 jaulas para ratones con comedero y bebedero
- La alimentación suministrada fue a libre acceso a base de dieta balanceada comercia en forma de pellets y agua estéril (tratada en el mismo laboratorio).

### 4.2 Químicos

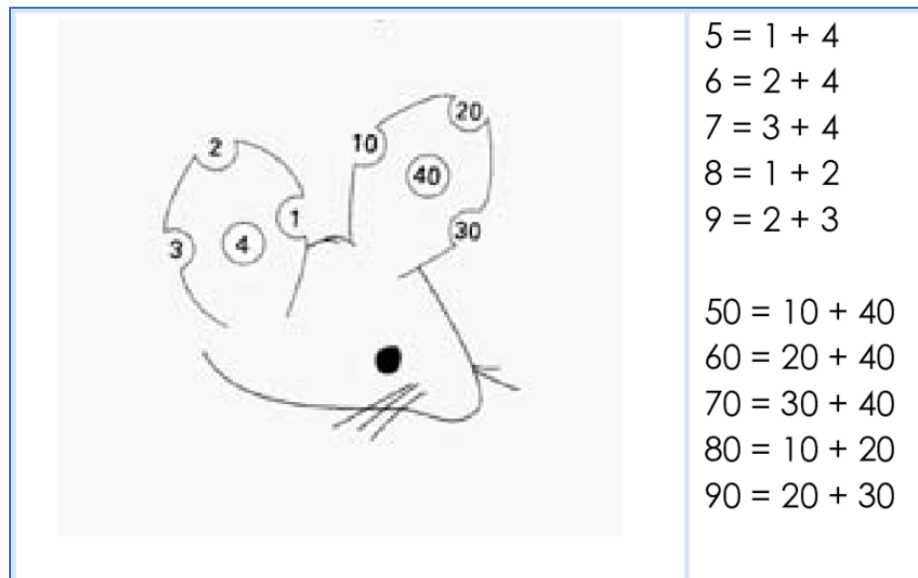
- Lactoferrina (Fracción Láctea)
- NaCl (Cloruro de Sodio)
- Goma arábica
- Colorante azul de Evans

### 4.3 Biológicos

Se utilizaron 16 ratones machos de la cepa C57Bl/6 de 6-12 semanas de edad suministrados por Janvier Labs. (LeGenest, Francia) divididos en grupos de 4 ratones por caja, en cama de aserrín y condiciones controladas por el mismo laboratorio ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 40-60% de humedad relativa y un ciclo de luz normal).

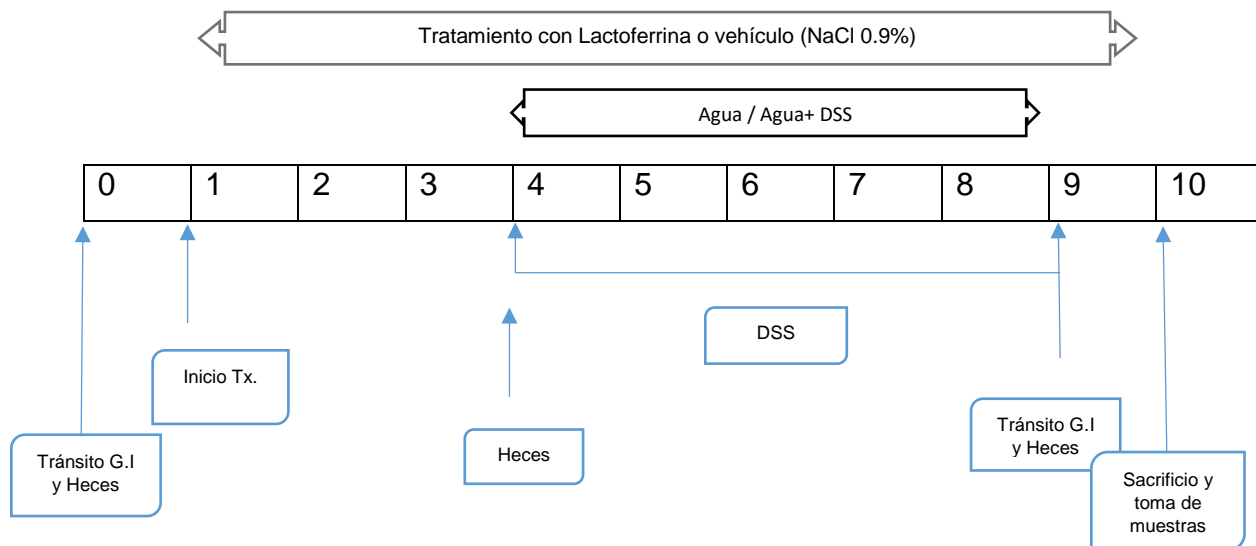
Los ratones fueron identificados con muescas en las orejas, el sistema de identificación del animalario preestablecido (Figura 4) y se agregó una marca en la cola para una fácil visualización y manejo.

Figura 4 Sistema de identificación utilizado en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón



Todos los protocolos de experimentación fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI 42/15) y se llevaron a cabo en acuerdo con la directiva 2016/63EU de la Unión Europea relativa a la protección de los animales de experimentación. Resumiendo, las actividades durante el ensayo se creó el siguiente cronograma (Figura5).

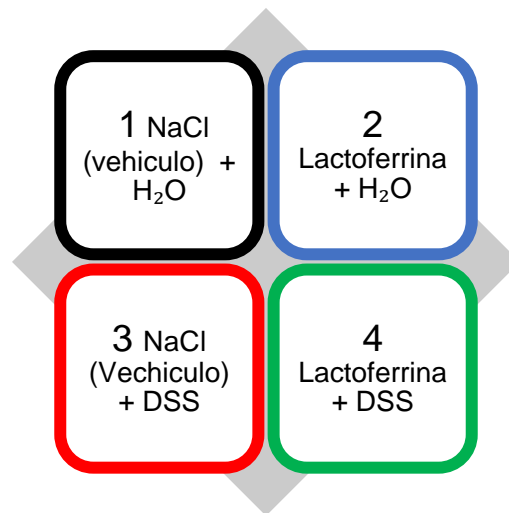
Figura 5 Cronograma de actividades realizadas durante el ensayo.





Los ratones fueron distribuidos en 4 grupos (Figura 6) de la siguiente manera e identificados con los siguientes colores:

Figura 6 Grupos del ensayo organizados e identificados con colores



#### 4.2 Administración de lactoferrina

De la forma en que está indicado en el cronograma a partir del 1 al día 9, a los grupos experimentales (2 y 4) les fue administrado por medio de una sonda, esofágica 100 µl de lactoferrina, previamente preparada (75mg en un microtubo y se añadió 600 µl de NaCl 0.9%). A los grupos control (1 y 3) también les fue administrado 100 µl de NaCl 0.9%, a continuación de esto se pesaron los animales y en dos días específicos se recolectaron muestras de heces directo del ano.

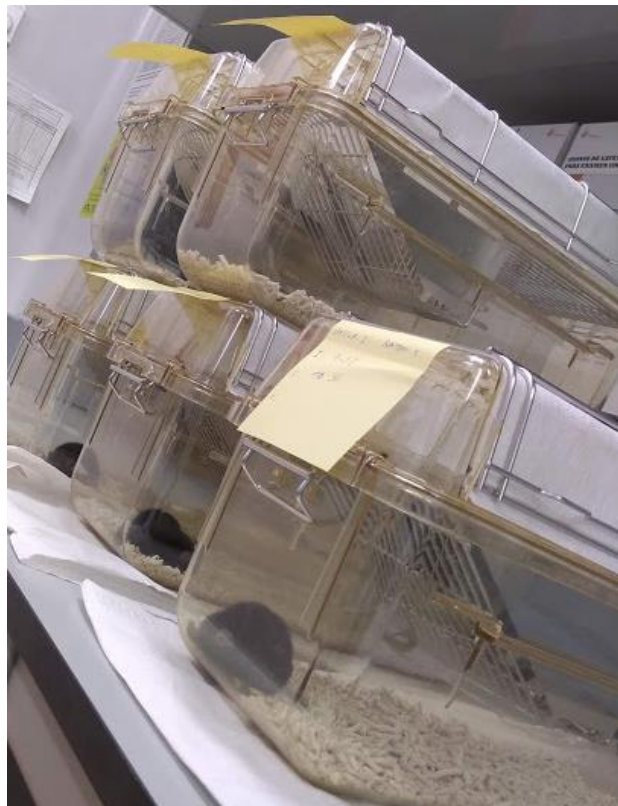
#### 4.3 Estudio del tránsito gastrointestinal *in vivo*

Es una técnica en la cual por medio de una sonda se administra una emulsión que contiene un colorante (azul de Evans) y tras su administración se mide el tiempo que transcurre desde el ingreso hasta que expulsa el ratón las primeras heces teñidas de azul, esto fue realizado de la siguiente manera:

Posterior a pesarlos y hacer el manejo correspondiente se disponía a individualizar a los animales en una jaula con un poco de viruta quitando alimento y el agua, dando un periodo de adaptación de una hora previa al sondaje, registrando la hora. Tras el paso del periodo de adaptación se procedió a sondear a cada ratón sujetándolo con una mano y administrando 200  $\mu$ l de la solución previamente preparada (agua del grifo, 5% de goma arábica y 5% del colorante azul de Evans completamente homogenizada) mediante una sonda curva registrando la hora, regresando al ratón a su caja procurando el menor estrés posible.

Se organizaron las cajas de una manera que fuera posible observarlas todas (Figura 7), para registrar la hora cuando se realizara la primera deposición de color oscuro azulado y después regresar a su caja a cada uno, de manera regular el tiempo que transcurre es de 1 – 3 horas. Se realizó un ensayo el día 0 del experimento y después del tratamiento para comparar.

*Figura 7 Ratones separados individualmente durante el ensayo del tránsito intestinal in vivo. Luis Miranda. 2019*



#### **4.4 Inducción de colitis mediante la administración de sulfato de dextrano sódico (DSS)**

La inducción de una inflamación aguda en el intestino de los ratones fue realizada por la administración de sulfato de dextrano (DSS) al 2.5% (p/v) disuelto en agua de bebida suministrada por el CIBA durante un periodo de 5 días *ad libitum*. A los grupos control se les proporcionó en las mismas condiciones el agua de bebida sin DSS.

Con un periodo de adaptación de 4 días previos realizando el manejo ya antes mencionado el día 4 del experimento tras recoger las heces y pesar a los animales se inicia con el tratamiento del DSS en agua de bebida, llevando a cabo un seguimiento diario y evolución de la colitis principalmente con la variación del peso de los animales respecto al primer día y la aparición de sangre oculta y/o visible en heces mediante el kit *Tri Slider FOB Guayaco* (Sanilabo, España).

#### **4.5 Parámetros tomados en cuenta para el score clínico**

Se asignó un número de acuerdo a la gravedad de cada parámetro del 0 al 4 realizando una evaluación diaria de los siguientes factores:

- a) Consistencia de las heces
  - **0:** normal
  - **1:** heces blandas
  - **4:** diarrea
- b) Presencia de sangre en heces
  - **0:** negativo
  - **2:** sangre oculta
  - **4:** sangre visible
- c) Porcentaje de pérdida de peso
  - **0:**  $\leq 1\%$
  - **1:** 1-5%

- 2: 5-10%
- 3: 10–15%
- 4:  $\geq 15\%$ ).

#### **4.6 Sacrificio y obtención de muestras**

Los animales fueron sacrificados un día después de finalizar el tratamiento con el DSS mediante dislocación cervical, inmediatamente se realizó una laparotomía para extraer el colon, estimando mediante una puntuación macroscópica el grado de colitis tomando en cuenta las siguientes condiciones:

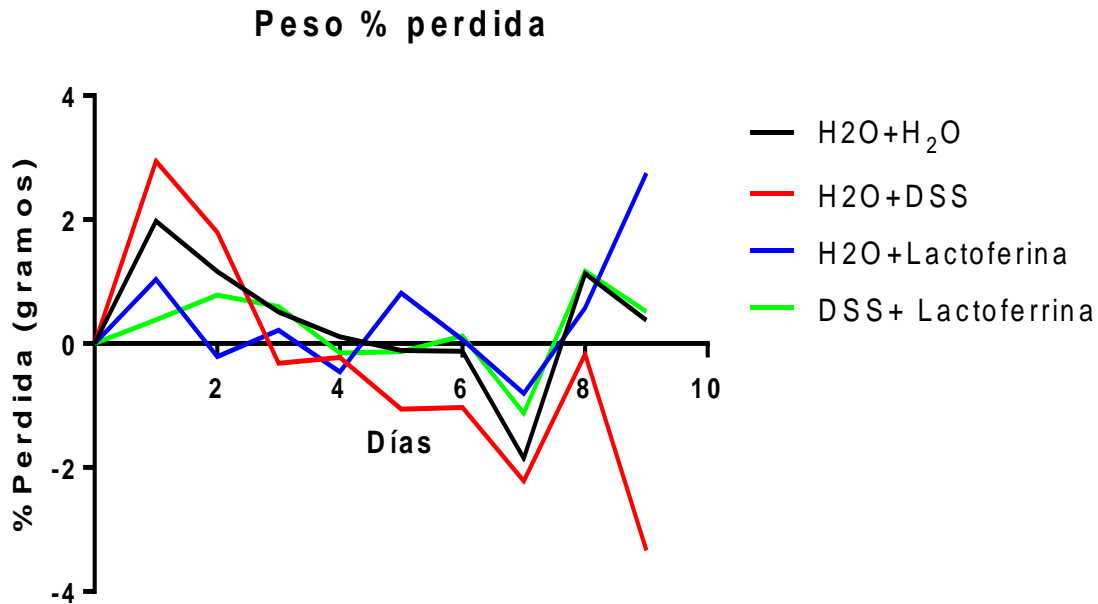
- ❖ Adherencias
  - 0 puntos: ausencia
  - 1-3 puntos: dependiendo de la severidad.
  
- ❖ Diarrea
  - 0: ausencia
  - 1: blando
  - 2: líquido
  
- ❖ Edema
  - 0 ausencia
  - 1: medio
  - 2: severo
  
- ❖ Estenosis
  - 0: ausencia
  - 1-3: dependiendo de la gravedad
  
- ❖ Moco
  - 0: ausencia
  - 1: presencia

- ❖ Hemorragias
  - 0: ausencia
  - 1: presencia
  
- ❖ Eritema
  - 0: ausencia
  - 1: <1cm
  - 2: >1cm
  
- ❖ Úlceras
  - 0: ausencia
  - 1: <1cm
  - 2: >1cm

## 5.- RESULTADOS

En la figura 8 se presenta el porcentaje de pérdida de peso durante la inducción de colitis. Los animales de los 4 grupos comenzaron a perder peso a partir del tercer día de la inducción de la colitis. A partir de este día fueron perdiendo peso progresivamente hasta llegar a perder más del 20% de su peso el grupo inducido con DSS y no tratado con lactoferrina registrado el día 7, mientras que el grupo control al día 7 no alcanzó el 20% de pérdida y el grupo experimental el porcentaje máximo de pérdida lo alcanzó el mismo día 7 pero con una pérdida menor del 7%. Se logra apreciar que en los grupos tratados con lactoferrina el porcentaje de pérdida fue menor de casi un 10% menor en comparación con los que no recibieron la lactoferrina, lo que podría indicar que el efecto de la lactoferrina ayuda a la disminución de la pérdida de peso ante la colitis inducida con DSS.

Figura 8 Porcentajes de pérdida de peso durante el ensayo.

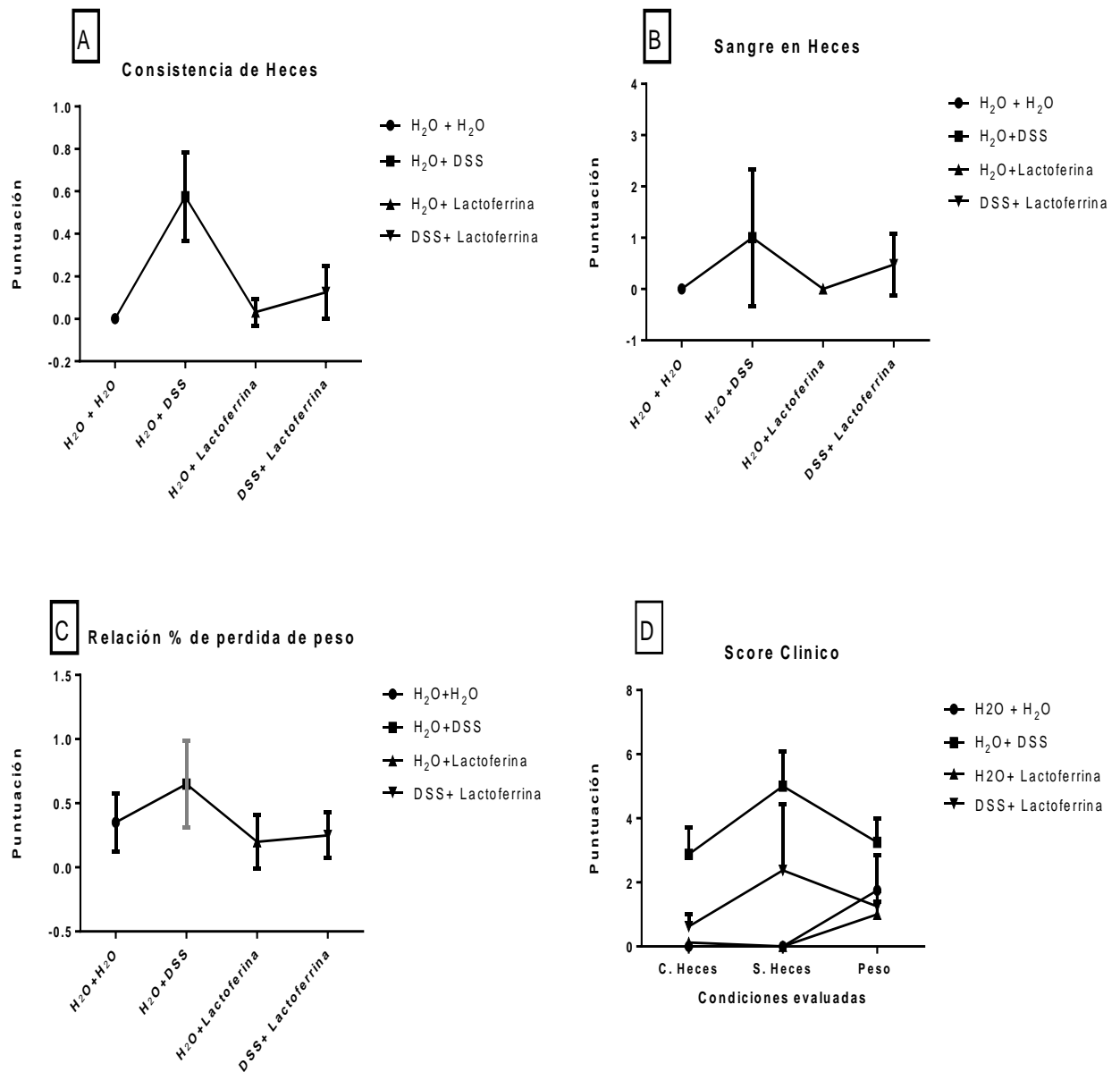


Evaluación del progreso de pérdida de peso en ratones inducidos con DSS durante 5 días. Ratones machos de la cepa C57Bl/6 de 6-12 semanas de edad suministrados por Janvier Labs. (LeGenest, Francia). El seguimiento diario inicio el día 0 en el que los animales fueron separados en 4 grupos y 3 días de seguimientos previos al día 4 de la administración de agua de bebida con DSS hasta el día 10 del sacrificio

La figura 9 representa el score clínico realizado durante la administración del DSS, la consistencia de heces presentó cambios desde el día 1 (primer día que se administró el DSS) a comparación de los otros 3 grupos en los cuales en un solo ratón se produjo reblandecimiento de las heces, en cuanto a la sangre en heces a partir del tercer día de tratamiento se encontró sangre oculta en 1 ratón de cada grupo con DSS y para el 5 día en el grupo control DSS 3 de 4 ratones presentaron sangre visible, contra 1 ratón que presentó sangre oculta del grupo inducido con DSS tratado con lactoferrina, el porcentaje de pérdida de peso que se muestra en este grafico solo muestra evaluación únicamente durante 5 días otorgando una puntuación dependiendo del porcentaje de perdida, se aprecia una ligera diferencia entre los grupos tratados con lactoferrina, estas condiciones nos podrían indicar que los efectos propuestos por la lactoferrina se cumplen al tener un efecto en la pared

bacteriana evitando la proliferación de bacterias y ayudando a la reducción del impacto inflamatorio por su interacción con el sistema inmune, lo cual reduce el impacto de pérdida de peso por lo antes mencionado y por el alto contenido proteico, ya que contribuye a funciones básicas del organismo.

Figura 9 Evaluación clínica diaria durante el ensayo.



Se indujo colitis en ratones machos de la cepa C57Bl/6 de 6-12 semanas de edad suministrados por Janvier Labs. (LeGenest, Francia) tal y como está descrito en materiales y métodos. La evaluación se realizó durante 5 días iniciando el día 1 del tratamiento con el DSS hasta el día 5 (un día antes del sacrificio).



Figura 10 Resultados del examen macroscópico

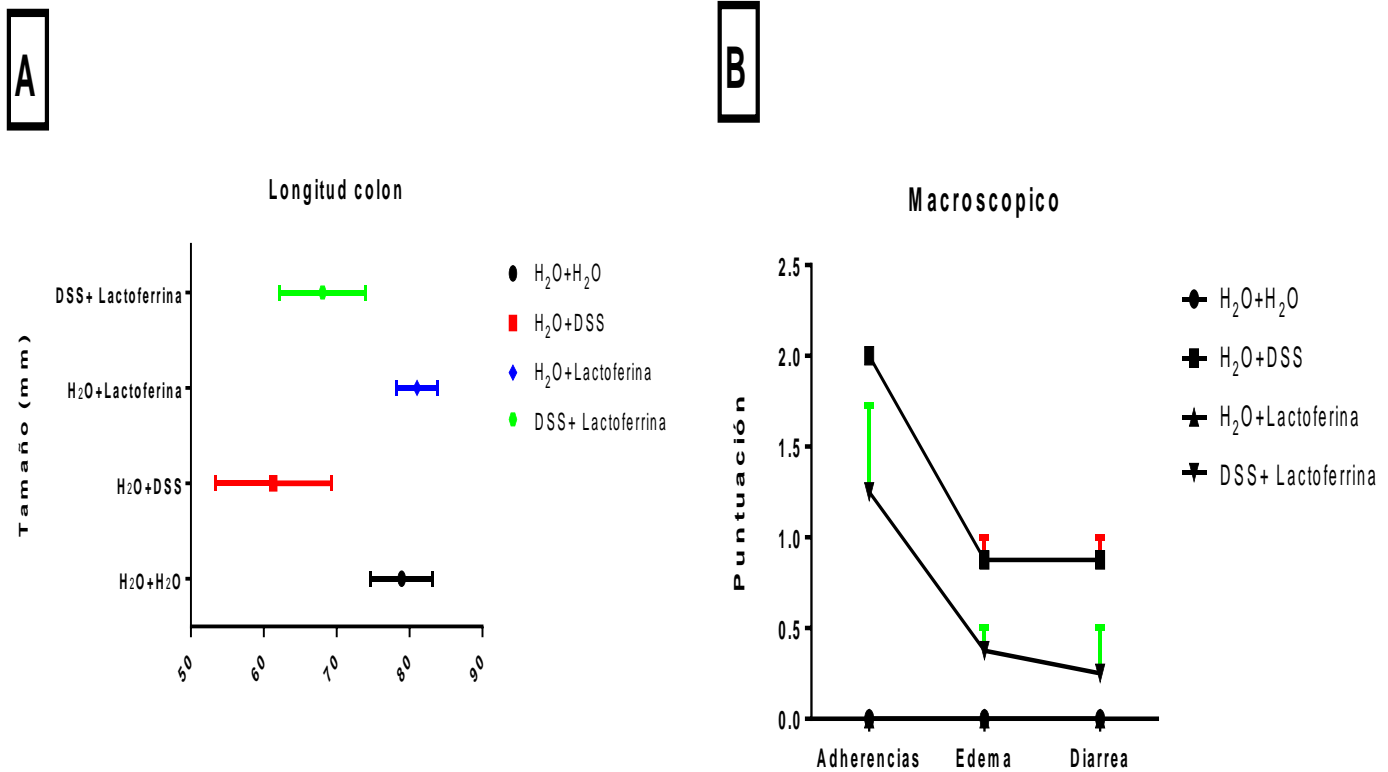


Figura 9. Se indujo colitis en ratones machos de la cepa C57Bl/6 de 6-12 semanas de edad suministrados por Janvier Labs. (LeGenest, Francia) tras 5 días de la inducción se sacrificaron los ratones tal como se menciona en materiales y métodos, se realizó la valoración macroscópica resaltando adherencias, edema y diarrea. La medición del colon fue realizada solo longitudinalmente debido a que el ancho era muy complicado aún con instrumentos de precisión. (A) Longitud del colon expresada en milímetros, medidos con una regla, presentada con la media y su desviación estándar. (B) La puntuación dada al examen macroscópico previa a la recolección de tejidos con los valores mencionados en materiales y métodos, se omitieron las características que en al menos un ratón no fueron registradas, se muestra la media con la desviación estándar de cada grupo.

En la figura 10 se muestra la evaluación realizada tras el sacrificio de los ratones en la cual la longitud del colon se vio reducida en el grupo experimental inducido con DSS y no tratado con lactoferrina, en comparación con los dos grupos tratados con lactoferrina, además de la longitud se aplicó una valoración visual macroscópica en

la cual a pesar de no enmostrar un score alto, se muestra un mínimo impacto en el grupo experimental tratado con lactoferrina en comparación con el grupo con DSS.

En la figura 11 se puede apreciar muestras del colon con su respectiva medición de un animal de cada grupo, encontrando en una primera impresión visual diferencia entre el grupo control(A) y el tratado con DSS únicamente (B) de aproximadamente 3 cm de diferencia y en cuanto al grupo tratado (C) respecto al control es de casi 1.5 cm, infiriendo que se redujo el impacto inflamatorio y acortamiento del colon (signo importante en la enfermedad inflamatoria intestinal);

Figura 11 Medición de la longitud del colon en los diferentes grupos experimentales

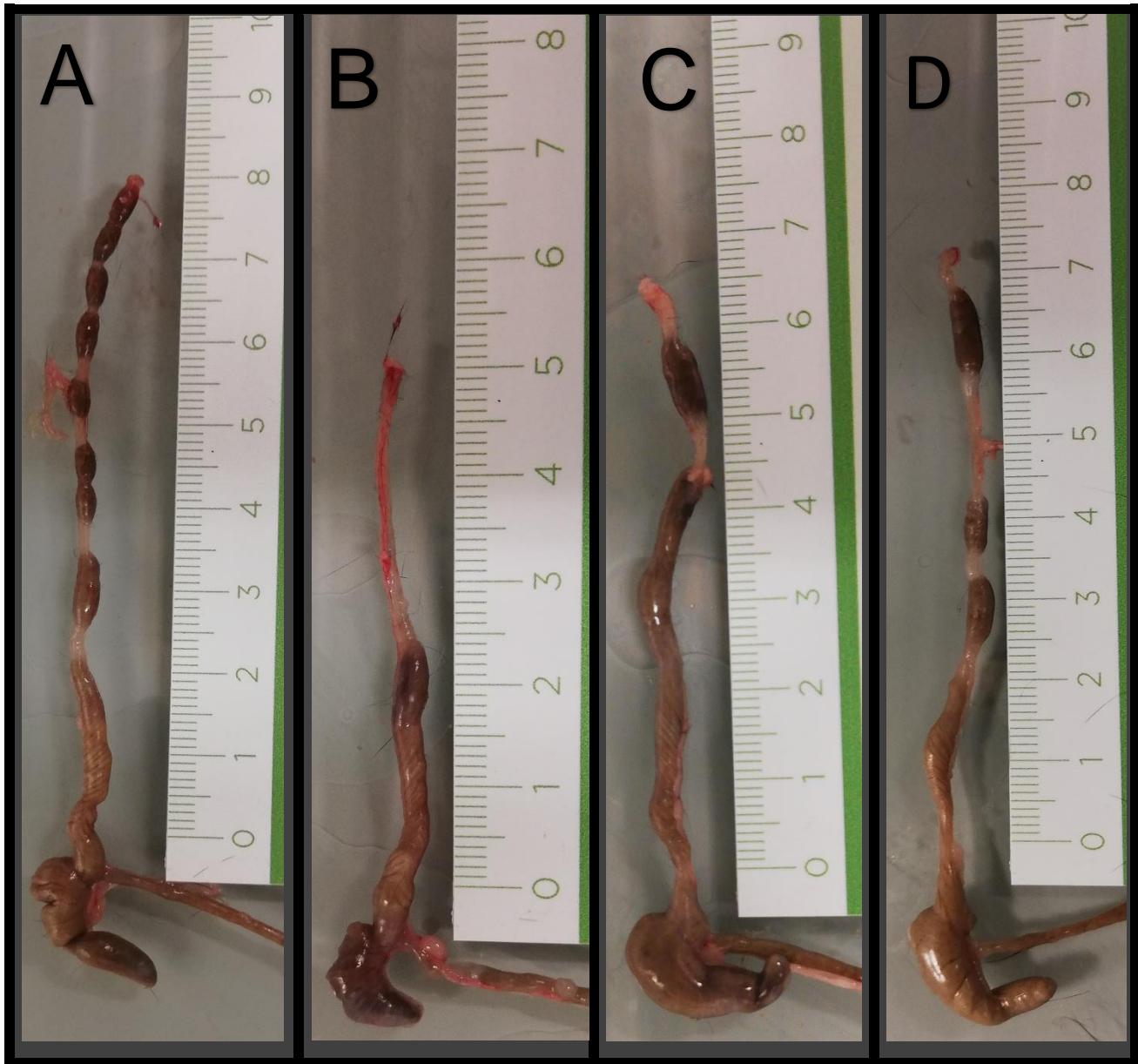
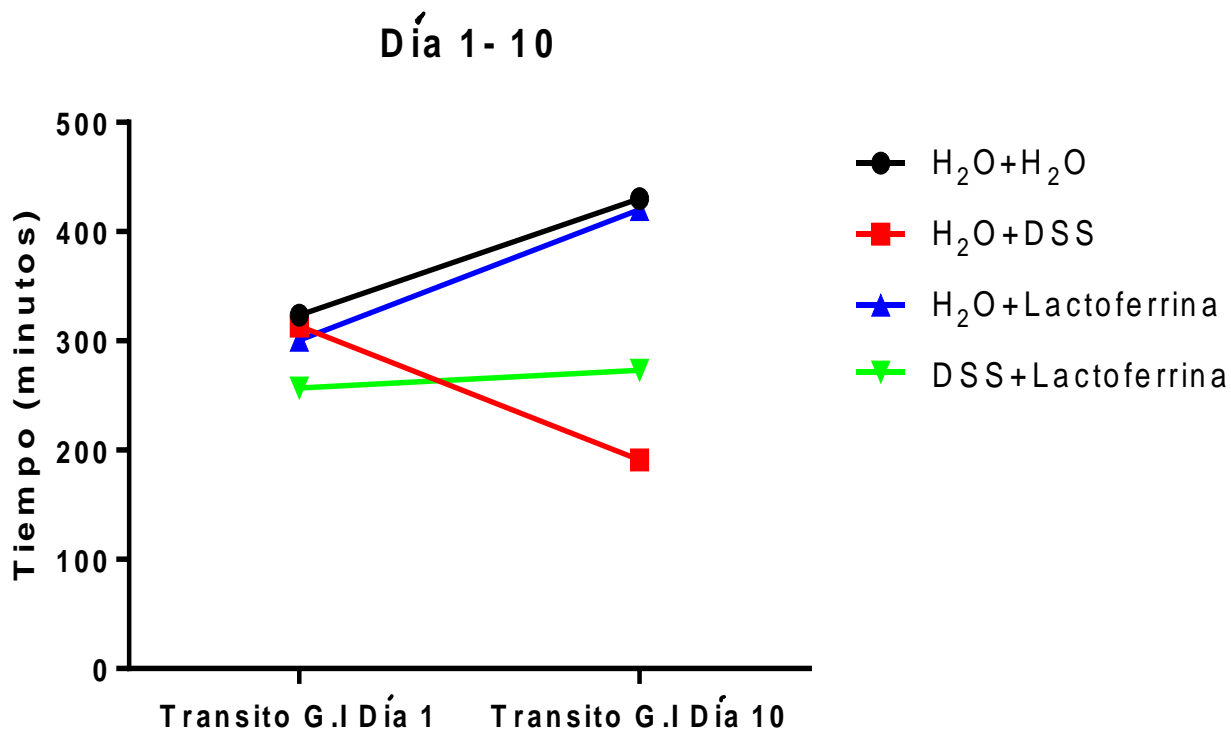


Figura 10. Se indujo colitis en ratones machos de la cepa C57Bl/6 de 6-12 semanas de edad suministrados por Janvier Labs. (LeGenest, Francia) tras 5 días de la inducción se sacrifican los ratones tal como se menciona en materiales y métodos, se realizó el sacrificio y se extrajo el colon. (A) Colon de un ratón del grupo control, 8cm. (B) Colon de ratón del grupo experimental tratado con DSS por 5 días, aproximadamente 5cm. (C) Muestra del grupo que recibió tratamiento con lactoferrina durante 9 días (4 días previos al DSS y los 5 días de la administración del DSS) 6.7 cm aproximadamente. (D) Muestra obtenida del grupo control tratado con lactoferrina durante 9 días únicamente 7.5 cm aprox.

Figura 12 Comparativo del tránsito gastrointestinal



Cambios en el tiempo del tránsito gastrointestinal representando la media de cada grupo reportado en minutos, el color negro representa en grupo control y el verde el tratado con DSS más lactoferrina, el proceso por el cual se llevaron a cabo la medición esta detallado en los métodos.

En la figura 12 se aprecia el comparativo del tiempo registrado de tránsito gastrointestinal, desde que ingresa el colorante por medio de la sonda hasta el momento que el ratón defeca la primeras heces coloreadas; La primera medición fue realizada el día 1 teniendo una media similar en los 4 grupos, para la segunda medición a los 10 días el grupo tratado con DSS sufrió una disminución de más de 100 minutos, comparando con el control que aumento casi el mismo tiempo y el tratado con DSS y lactoferrina el cuál se mantuvo con una variación menor a 30 minutos conforme a la media. Esto se podría deber a que el DSS causa una inflamación aguda del colon y por consiguiente un acortamiento del mismo, provocando que el tiempo del tránsito intestinal sea menor. Aunque hubo una

variación menor en el grupo tratado con DSS más lactoferrina no se podría concluir que esto ayudó a la mantener la motilidad intestinal, debido a que la variación entre los miembros del grupo fue alta y se deben tomar en cuenta consideraciones como el estrés y que a medida que pasan los días y la edad de los animales aumenta el tránsito igual.

## 6.-DISCUSIÓN

Numerosos ensayos con roedores durante los últimos 25 años han utilizado el modelo de inducción de colitis con DSS debido a que es el que más se asemeja en la morfología de daño epitelial observado en la colitis ulcerosa humana (Derrick D et al.2017). Desde 1990 (Okayasu, 2009) propuso este modelo debido a su eficacia y su fácil reproductibilidad, es por eso que fue elegido para nuestro experimento, además de ser el más utilizado actualmente.

El DSS es un polisacárido sulfatado que penetra en el epitelio gastrointestinal y provoca la disrupción de la barrera formada por el epitelio, causando de esta manera el contacto directo del lumen del intestino con células del sistema inmune de la mucosa. (Cerar; Shea-Donohue et al.2012; Randhawa et al.2014). Debido a la carga altamente negativa aportada por los grupos sulfato, es tóxico para los epitelios del colon causando erosiones que finalmente comprometen la integridad de la barrera, lo que aumenta la permeabilidad del epitelio del colon, Además, su propiedad anticoagulante agrava el sangrado intestinal. (Chassaing et al. 2014)

Durante la manifestación clínica de la colitis por DSS en la fase aguda se analizaron los signos de: pérdida de peso, diarrea, sangre oculta en las heces, anemia y eventualmente la muerte, siendo estas las características principales de la enfermedad. (Perse y March 2012). Por lo tanto, el DSS causa notablemente colitis aguda que se caracteriza morfológica y macroscópicamente por hiperemia, ulceraciones, edema submucoso moderado a severo, lesiones acompañadas de cambios histopatológicos que incluyen infiltración de granulocitos, cuyos síntomas finalmente se manifiestan en forma de diarrea con sangre. (Dharmani, et al. 2011). Utiliza además de los signos clínicos mencionados el prolapso rectal dentro de los parámetros clínicos para evaluar la colitis. (Kim et al. 2012)

A partir del día dos de la inducción con DSS se empezaron a ver signos clínicos en la consistencia de las heces y la pérdida de peso, sin embargo a nivel celular desde el día 1 se pueden observar cambios cronológicos en la expresión de proteínas de

unión apretada como ocludina, Zonula occludens-1 (ZO-1) y varias claudinas; estos modestos efectos iniciales son seguidos por síntomas cada vez más graves, que incluyen un aumento de la permeabilidad intestinal, sangrado severo y mortalidad (Eichele y Kharbanda; 2017)

Considerando lo previamente descrito de la colitis realizar la evaluación de la gravedad diariamente mediante el uso combinado de un índice de actividad de la enfermedad (DAI) descrito por Murthy, et al. (1993). Se observó que los valores máximos el día 5, descrito también en otros estudios (Petersson et al. 2011) el grosor del moco del colon disminuyó, mientras que el DAI aumentó durante la inducción de colitis por DSS y alcanzó su mayor significancia al día 5 después de la inducción con DSS. Esto podría deberse a que el DSS destruye el gel de moco permitiendo que las bacterias lleguen al epitelio dando como resultado de la inflamación del epitelio lo cual afecta negativamente la producción de moco por las células caliciformes. (Petersson et al. 2011)

En el estudio de la respuesta a la enfermedad (Chassaing et al. 2014) los autores demuestran que los ratones con DSS perderán 20-30% de peso corporal dependiendo de la concentración y a la duración de la exposición con DSS. La representación gráfica del porcentaje de pérdida / ganancia en peso corporal es una forma estándar de representar la progresión de la enfermedad en este modelo de colitis. La pérdida de peso corporal y el sangrado rectal también se asocian con adelgazamiento y acortamiento del colon.

Los resultados obtenidos en el estudio del tránsito intestinal pre y post tratamiento fue similar al reportado por (Kodami et al. 2018) En este estudio se utilizaron ratones normales y el tiempo de tránsito gastrointestinal (GIT) se prolongó con el aumento de la edad (de 8 a 32 semanas). Dos semanas después del inicio del experimento, GIT fue más corto en ratones con colitis inducida por DSS que en los controles normales, aunque la diferencia no fue significativa. Por otro lado, a las cuatro semanas más tarde, GIT fue significativamente más prolongado en ratones con colitis inducida por DSS que en los controles normales. Sin embargo, GIT

nuevamente se volvió significativamente más corto en ratones en la fase de resolución (a las 24 semanas) de colitis DSS.

Se ha demostrado el efecto positivo de la lactoferrina en los signos clínicos evaluados y en el comportamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal provocada por el DSS ya que se ha descrito que la lactoferrina administrada vía intragástrica en ratones sanos, por cuatro o seis semanas aumentó las concentraciones basales de IgA e IgG en saliva y líquido intestinal (Debbabi, et .al. 1998). La lactoferrina posee un efecto bacteriostático relativo a la inhibición de la multiplicación bacteriana que está relacionado a su capacidad de captación de  $Fe^{3+}$  (ion férrico) que es esencial para el crecimiento y la expresión de virulencia de algunos agentes patógenos. (Orsi, N 2006); El efecto bactericida de la lactoferrina está relacionado con su capacidad de interaccionar con cationes divalentes como el  $Ca^{+}$  que pueden contribuir a estabilizar la superficie bacteriana, dicho efecto desorganiza y desestabiliza la superficie celular causando la pérdida de la permeabilidad y finalmente la muerte celular; Por consiguiente, la acción moduladora de la lactoferrina le permite regular positiva o negativamente la inflamación de origen infeccioso. (Takakura, et. Al. 2006)

Wakabayashi, et al. (2006) propone que a nivel sistémico la lactoferrina suministrada a ratones sanos por vía intragástrica por un día promueve en sangre periférica el incremento de diversas células como leucocitos, granulocitos, linfocitos  $T \gamma / \delta$ , así como de linfocitos  $ThCD3^{+}$  y  $CD4^{+}$ , estas acciones específicas pueden estar relacionadas con los efectos inmunomoduladores sistémicos y protectores del huésped de la administración de lactoferrina y por consiguiente se podrían conseguir los efectos antiinflamatorios en el ensayo.

Otra propiedad atribuida a la lactoferrina oral sobre la mucosa intestinal del ratón es la de estimular la producción de citocinas (IL-18 e IFNs tipo 1  $\alpha$  y  $\beta$  que potencian la actividad citotóxica de los linfocitos y células NK. (Kuhara., et al. 2006). Diversos estudios muestran que la lactoferrina es capaz de promover la respuesta de linfocitos  $Th1$ ,  $Th2$  y de linfocitos  $Th$  reguladores de origen tímico (Takakura N., et al. 2006) y proponen que el efecto de la lactoferrina sobre la respuesta linfocitaria



depende del status de maduración y de activación de las subpoblaciones Th1/Th2.  
(Fischer., et al. 2006).

## 7.- CONCLUSIÓN

El modelo de inducción mediante DSS implementado mostró ser efectivo para inducir la colitis en el grupo experimental, las lesiones descritas se apegan al efecto que provoca este síndrome, por lo cual se concluye que el objetivo de inducir colitis fue alcanzado.

En cuanto a la medición del tránsito gastrointestinal, a pesar de ser un procedimiento sencillo es útil para valorar los daños inflamatorios provocados en el epitelio intestinal por la acción del DSS.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente podemos inferir que el efecto modulador de la lactoferrina sobre el sistema inmunitario y el mecanismo específico bacteriostático y bactericida que posee es la razón de los efectos mostrados, en conjunto con la propiedad antiinflamatoria frente a la inducción de colitis por el DSS mostrada.

Al ser ingerida la lactoferrina modula la respuesta inmunitaria a nivel local y sistémico de células inmunocompetentes del epitelio intestinal y del tejido linfoide asociado a mucosas. Y un mecanismo sobre el efecto antiinflamatorio atribuido a la lactoferrina radica en su capacidad de inhibir la producción de mediadores proinflamatorios al unirse al LPS e impedir su unión a receptores mCD14 y finalmente contra el TLR-4.

Finalmente podemos concluir que, a pesar de lo demostrado en este ensayo, se necesita complementar con estudios de histopatología y moleculares para corroborar la acción de la lactoferrina que al ser moduladora y antiinflamatoria logre reducir el impacto directamente sobre las células de la mucosa intestinal. Así como que su administración a largo plazo no cause desequilibrios en la microbiota intestinal o en el sistema inmune del aparato digestivo.

## 8.- BIBLIOGRAFIA

Akers R, Denbow D, Anatomía y Fisiología de animales domésticos 1 Edición, IA, 2008.

Benoit Chassaing, Jesse D. Aitken , Madhu Malleshappa y Matam Vijay-Kumar (2014) Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice doi: 10.1002/0471142735.im1525s104

Cerar, A. (2012) Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model : Traps and Tricks, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012. doi: 10.1155/2012/718617.

Chassaing, B., Aitken, JD, Malleshappa, M. y Vijay-Kumar, M. (2014). Colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) en ratones. Protocolos actuales en inmunología, 104 ,15.25.115.25.14. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>

Debbabi, H., Dubarry, M., Rautureau, M. y Tomé, D. (1998). La lactoferrina bovina induce tanto la respuesta inmune sistémica como mucosa en ratones. Journal of Dairy Research, 65 (2), 283-293 [10.1017 / s0022029997002732](https://doi.org/10.1017/s0022029997002732)

Derrick D Eichele & Kusum K Kharbanda. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. World Journal of Gastroenterology, Vol 23 ISSN 1007-9327, 13 pages. 2016, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5597494/pdf/WJG-23-6016.pdf>

Derrick D Eichele y Kusum K Kharbanda (2017) Modelo murino de colitis por sulfato sódico de dextrano: una herramienta indispensable para avanzar en nuestra comprensión de la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales, *World J Gastroenterol*, 23 (33): 6016–6029, [10.3748 / wjg.v23.i33.6016](https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6016)

Fischer R , Debbabi H , Dubarry M , Boyaka P , Tomé D (2006). Regulación de las respuestas fisiológicas y patológicas Th1 y Th2 por lactoferrina. Biochem Cell Biol.

Biochem Cell Biol. , 84(3): 303-11, 6. 2006, Recuperado de <https://doi.org/10.1139/o06-058>.

Janice J. Kim, Md. Sharif Shajib, Marcus M. Manocha, Waliul I. Khan. (2012). Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. Journal of Visualized Experiments, 60, Page 5 of 6. 2012, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369627/pdf/jove-60-3678.pdf>.

Kapsenberg ML. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol. 3:984-93

Kodani, M., Fukui, H., Tomita, T., Oshima, T., Watari, J. y Miwa, H. (2018). Asociación entre la motilidad gastrointestinal y la distribución de macrófagos / mastocitos en ratones durante la etapa de curación después de la colitis inducida por DSS. Informes de medicina molecular , 17 (6), 8167–8172. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8926>

Kuhara T, Yamauchi K, Tamura Y, Okamura H. (2006) Oral administration of lactoferrin increases NK cell activity in mice via increased production of IL-18 and type I IFN in the small intestine. *J Interferon Cytokine Res*. Revista de investigación de interferón y citoquinas, Volumen: 26 Número 7 <http://doi.org/10.1089/jir.2006.26.489>

Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M., & Mazurier, J. (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 62(22), 2549–2559. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5370-2>.

Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal (2019) Atlas de Histología Animal y Vegetal, Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo

Martina Perse & Anton Cerar. (March 2012). Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. Journal of Biomedicine and Biotechnology , Volume 2012, 13 pages, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361365/pdf/JBB2012-718617.pdf>.

Medzhitov R, Janeway C Jr. (2000) Innate immunity. *N Engl J Med.*;343:338-44.

Murthy PhD , Dr. Harry S. Cooper ,Helen Shim MD ,Rupal S. Shah BS ,Samih A. Ibrahim MS yDeborah J. Sedergran MT . (1993). Tratamiento de la colitis murina inducida por sulfato de dextrano por ciclosporina intracolónica. *Digestive Diseases and Sciences* , , volumen 38, pp. 1722 - 1734. 1992, <https://link.springer.com/article/10.1007%2F01303184>.

Okayasu I , Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. (1990) . Un método novedoso en la inducción de colitis ulcerosa aguda y crónica experimental confiable en ratones. *Gastroenterología* . ; **98** : 694-702.

Orsi, N. (2004) La actividad antimicrobiana de la lactoferrina: estado actual y perspectivas. *Biometals* 17, 189-196. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027691.86757.e2>

Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, GC, Gendler, SJ, Velcich, A., Lundberg, JO, Roos, S., Holm, L. y Phillipson, M. (2011). Importancia y regulación de la barrera mucosa del colon en un modelo de colitis en ratones. *Revista estadounidense de fisiología. Fisiología gastrointestinal y hepática* , 300 (2), G327 – G333. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00422.2010>

Poonam Dharmani, Pearl Leung, Kris Chadee. (2011). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Muc2 Mucin Play Major Roles in Disease Onset and Progression in Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis. *PLoS ONE* , E 6(9): e25058., 13 pages. August 18, 2011; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176316/pdf/pone.0025058.pdf>.

Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N. and Jaggi, A. S. (2014) 'A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents', *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 18(4), pp. 279–288. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.4.279

Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol.* 2004;4: 953-64.

Shea-Donohue, T., Notari, L., Sun, R. and Zhao, A. (2012) 'Mechanisms of smooth muscle responses to inflammation', *Neurogastroenterology and Motility*. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01986.x.

Smythies LE, Sellers M, Clements RH (2005); Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest*. 115:66-75

Takakura N, Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. (2006) Influences of orally administered lactoferrin on IFN- $\gamma$  and IL-10 production by intestinal intraepithelial lymphocytes and mesenteric lymph-node cells. *Biochem Cell Biol.*; 84: 363-8. <https://doi.org/10.1139/o06-056>

Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H. (2002). ovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. . *Biochem Cell Biol.*, , 80 (1): 109-112, , 6., <https://doi.org/10.1139/o01-230>.

Wakabayashi, H., Takakura, N., Yamauchi, K. y Tamura, Y. (2006). Modulación de la expresión génica relacionada con la inmunidad en el intestino delgado de ratones mediante la administración oral de lactoferrina. *Inmunología clínica y de vacunas: CVI* , 13 (2), 239–245. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.2.239-245.2006>