

# La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria

María Elisa Drago-Serrano,<sup>\*,§</sup> Leopoldo Flores-Romo,<sup>\*\*,§</sup> Gabriela Oliver-Aguillón,<sup>\*\*\*</sup> Rosa Adriana Jarillo-Luna,<sup>\*\*\*</sup> Humberto Reina-Garfias,<sup>\*\*\*</sup> Elizabeth Barbosa-Cabrera,<sup>\*\*\*</sup>  
Rafael Campos-Rodríguez<sup>\*\*\*,§</sup>

## RESUMEN

Los mamíferos producen lactoferrina, una glicoproteína monomérica no hémica de unión a hierro que es considerada componente esencial de la inmunidad innata del hospedero. El objetivo de esta revisión es presentar los principales efectos inmunorreguladores de la lactoferrina heteróloga, administrada por vía oral o parenteral en animales de experimentación sanos o infectados con bacterias patógenas. La lactoferrina bovina y la humana estimulan o inhiben diversos componentes humorales y celulares de la inmunidad implicados en la prevención y/o resolución de infecciones y de la inflamación asociada a estas últimas. El efecto modulador de la lactoferrina heteróloga tiene implicaciones prácticas por sus posibles aplicaciones terapéuticas, profilácticas y adyuvantes. La comprensión integral de la influencia de la lactoferrina sobre la respuesta inmunitaria y sus limitantes son de fundamental relevancia para su aplicación racional en el control de diversas enfermedades causadas por bacterias patógenas.

**Palabras clave:** Inmunidad intestinal, respuesta innata, inflamación, proteínas eucarióticas de unión a hierro, lactoferrina.

## INTRODUCCIÓN

Los mamíferos producen lactoferrina, una glicoproteína monomérica no hémica de unión a hierro de 80 kDa perteneciente a la familia de las transferrinas.<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Mammals produce lactoferrin. It is a nonheme iron binding monomeric glycoprotein considered an essential component of the host innate immune response. The aim of this review was to present the main immunomodulatory effects on the after the exposition of heterologous lactoferrin administered by oral or parental routes in experimental animals whether healthy or infected with pathogenic bacteria. Bovine and human lactoferrin enhance or inhibit several humoral and cellular components of immune response involved in prevention or/and resolution of infection and inflammation associated to them. Modulatory effects of heterologous lactoferrin have potential prophylactic, therapeutic, and adjuvant applications. A better understanding of the influence of lactoferrin on immune and inflammatory responses, and its limitations is critically relevant to explore its application on the control of diseases caused by pathogenic bacteria.*

**Key words:** Intestinal immunity, innate response, inflammation, eukaryotic iron binding proteins, lactoferrin.

La lactoferrina está distribuida en leche, calostro, saliva, lágrimas, bilis, secreciones vaginales, semen, fluido bronquial y en gránulos secundarios de neutrófilos.<sup>1</sup> La lactoferrina endógena es una molécula con propiedades antimicrobianas que se considera un

\* Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México, D.F.

\*\* Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

\*\*\* Departamento de Bioquímica, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

§ Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F.

Correspondencia:

M en C María Elisa Drago-Serrano

Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso Núm. 1100, 04060 México, D.F., México. E-mail: mdrago@correo.xoc.uam.mx; dragome@yahoo.com

Recibido: 29-10-2007

Aceptado: 21-01-2008

componente esencial de la inmunidad innata del hospedero.<sup>2</sup> La contribución de la lactoferrina a la respuesta innata se relaciona con su estratégica presencia en líquidos secretados por los epitelios, expuestos continuamente a agentes patógenos que colonizan o invaden las mucosas, así como a su incremento al ser liberada como resultado de la degranulación de neutrófilos que ocurre durante la inflamación de origen infeccioso.<sup>2</sup>

En la actualidad, la lactoferrina bovina (Lfb) y la lactoferrina humana (Lfh) han sido las mejor caracterizadas desde el punto de vista estructural y funcional. En ensayos *in vitro* se ha evaluado la actividad antibacteriana de la lactoferrina que involucra su efecto bacteriostático y bactericida. El efecto bacteriostático relativo a la inhibición de la multiplicación bacteriana, está relacionado a su habilidad de captar Fe<sup>3+</sup> (ión férrico) que es esencial para el crecimiento y expresión de virulencia de algunos agentes patógenos.<sup>3</sup> El efecto bactericida radica en la capacidad de la lactoferrina de interaccionar con cationes divalentes como el Ca<sup>2+</sup> que contribuyen a estabilizar la superficie bacteriana y con componentes bacterianos con carga negativa como el lipopolisacárido (LPS). Dicha interacción desorganiza y desestabiliza la superficie celular causando la pérdida de la permeabilidad y finalmente la muerte celular.<sup>3,4</sup>

A nivel sistémico y local, la lactoferrina modula *in vivo* la función de componentes humorales y celulares de la respuesta innata como neutrófilos, células asesinas naturales (*natural killer cells* [NKs]), linfocitos T γ/δ, interferón α (IFN α) e IFN β, interleucina 18 (IL-18),<sup>5,6</sup> y adaptativa a través de anticuerpos, ILs, linfocitos Th1/Th2 y B.<sup>7-10</sup> La acción moduladora de la lactoferrina le permite regular positiva o negativamente la inflamación de origen infeccioso.<sup>11</sup> El efecto protector conferido por la lactoferrina resulta de la convergencia de eventos multifactoriales en los que está implicada su capacidad de interactuar con receptores de membrana de diversas células inmunocompetentes. A través de su unión a receptores, la lactoferrina modula la expresión de genes involucrados en diversas funciones como activación celular y producción de citocinas.<sup>12</sup> En los últimos años, la acción reguladora de la lactoferrina ha despertado creciente interés en el área clínica, por sus potenciales aplicaciones profilácticas y terapéuticas para el control de infecciones.<sup>3,13</sup> Gran parte del conocimiento sobre diversos efectos reguladores ha sido logrado mediante la administración de lactoferrina heteróloga de origen bovino<sup>13</sup> o humano<sup>14</sup> en varias

especies de animales de experimentación como ratones, ratas y conejos.

En este manuscrito se revisan algunos efectos de la administración de lactoferrina sobre componentes del sistema inmunitario que han sido evaluados *in vivo* bajo condiciones fisiológicas normales de salud así como de infección, particularmente de origen bacteriano.

## METODOLOGÍA

La elaboración de este trabajo implicó la búsqueda de artículos originales y de revisión de difusión internacional en el sitio [www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov). La lectura del título y el resumen fue el criterio primario de selección de las referencias. Al recuperar y analizar el texto completo de cada uno de los artículos, se descartaron aquellos que estuvieran fuera del alcance del objetivo del manuscrito. Se incluyeron artículos de revisión que proponen modelos sobre las bases celulares y moleculares del efecto regulador de la lactoferrina sobre componentes humorales y celulares de la inmunidad; trabajos de revisión extensiva sobre los receptores tipo toll y células T reguladoras, por mencionar algunos, necesarios para comprender el papel regulador de la lactoferrina.

Se rescataron y se incluyeron aquellos trabajos relacionados con el estudio del efecto regulador de la lactoferrina en animales sanos e infectados con bacterias patógenas, sus potenciales aplicaciones y limitantes. Algunos artículos sobre ensayos *in vitro* y *ex vivo* fueron también incluidos como complemento de evidencias generadas bajo condiciones *in vivo*. La elaboración del cuadro I se basó en la información descrita en artículos originales de investigación relativos al efecto de la lactoferrina en animales de experimentación infectados con diversas bacterias patógenas. Para una mayor claridad conceptual y gráfica, se realizaron ciertas modificaciones de los modelos de inmunorregulación de lactoferrina (*Figuras 1 y 2*) propuestos originalmente en los artículos de referencia.

### Influencia de la lactoferrina heteróloga sobre la respuesta inmunitaria en animales sanos

La acción moduladora de la lactoferrina ha sido analizada con mayor frecuencia sobre la respuesta inmune adaptativa que en la inmunidad innata.<sup>5</sup> Estudios experimentales *in vivo*, realizados en ratón, han evaluado con detalle los efectos de la Lfb o Lfh suministrada oralmente en la producción local y sistémica de

anticuerpos en animales sanos. La diversidad en la duración de los esquemas y modalidades de administración oral, así como las diferentes especies animales empleadas en los ensayos experimentales, ha permitido explorar las propiedades inmunogénicas y adyuvantes de la lactoferrina heteróloga y su efecto en su actividad inmunorreguladora. Se ha observado que la Lfb administrada por vía intragástrica (i.g.) en ratones sanos, por cuatro<sup>7</sup> o seis semanas,<sup>8</sup> aumentó las concentraciones basales de IgA e IgG en saliva<sup>7</sup> y líquido intestinal,<sup>7,8</sup> e incrementó los niveles de anticuerpos IgA e IgG específicos contra lactoferrina en líquido intestinal y suero<sup>7,8</sup> y también de IgM sérica antilactoferrina.<sup>8</sup> Se ha sugerido que la generación de anticuerpos antilactoferrina refleja la capacidad de la lactoferrina de unirse y activar células B y T vía receptor.<sup>15</sup> A su vez, la activación de linfocitos podría influir en la expresión de receptores específicos para lactoferrina. Aun cuando no se sabe el efecto de los anticuerpos anti-Lf sobre la acción moduladora de la lactoferrina, los anticuerpos específicos inducidos por la ingestión crónica de Lfb forman complejos inmunitarios que son eliminados por meca-

nismos de exclusión inmunitaria para reducir su riesgo potencial.<sup>15</sup>

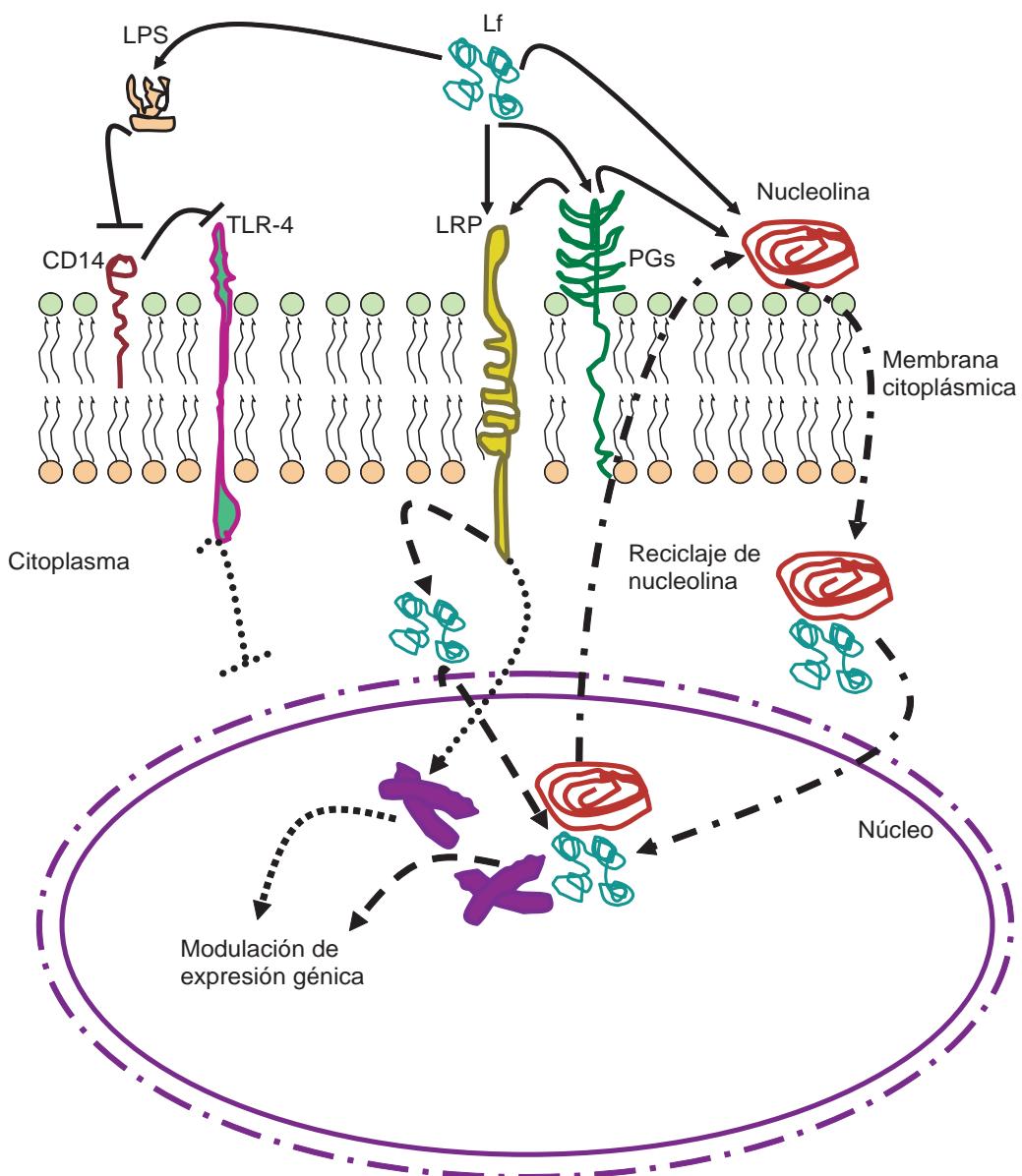
La acción de la lactoferrina sobre la producción de anticuerpos ha sido puesta en evidencia *ex vivo*. En cultivos celulares de placas de Peyer o de células de bazo de ratones tratados vía i.g. con Lfb y estimulados *in vitro* con Lfb, se incrementó el total de anticuerpos IgA e IgG.<sup>7,8</sup> Además de influir en la respuesta de anticuerpos, la lactoferrina estimula la proliferación celular, como se ha observado en cultivos celulares de placas de Peyer<sup>7</sup> o bazo<sup>7,8</sup> de ratones tratados vía i.g. con Lfb y estimulados con Lfb o con canavalina A (ConA).

Un aspecto relevante de la influencia de la lactoferrina sobre la producción de anticuerpos y la proliferación celular, es su relación con el tipo de administración oral y la forma en que la lactoferrina es administrada, como se reportó en ratones sanos tratados con Lfb.<sup>8</sup> La ingestión libre de Lfb adicionada en el alimento y la administración de una dosis diaria aplicada por vía bucal o i.g., favorecieron la producción total de IgA e IgG en secreciones intestinales y en suero, así como la producción de anticuerpos en

**Cuadro I.** Influencia de lactoferrina en infecciones bacterianas en animales de experimentación.

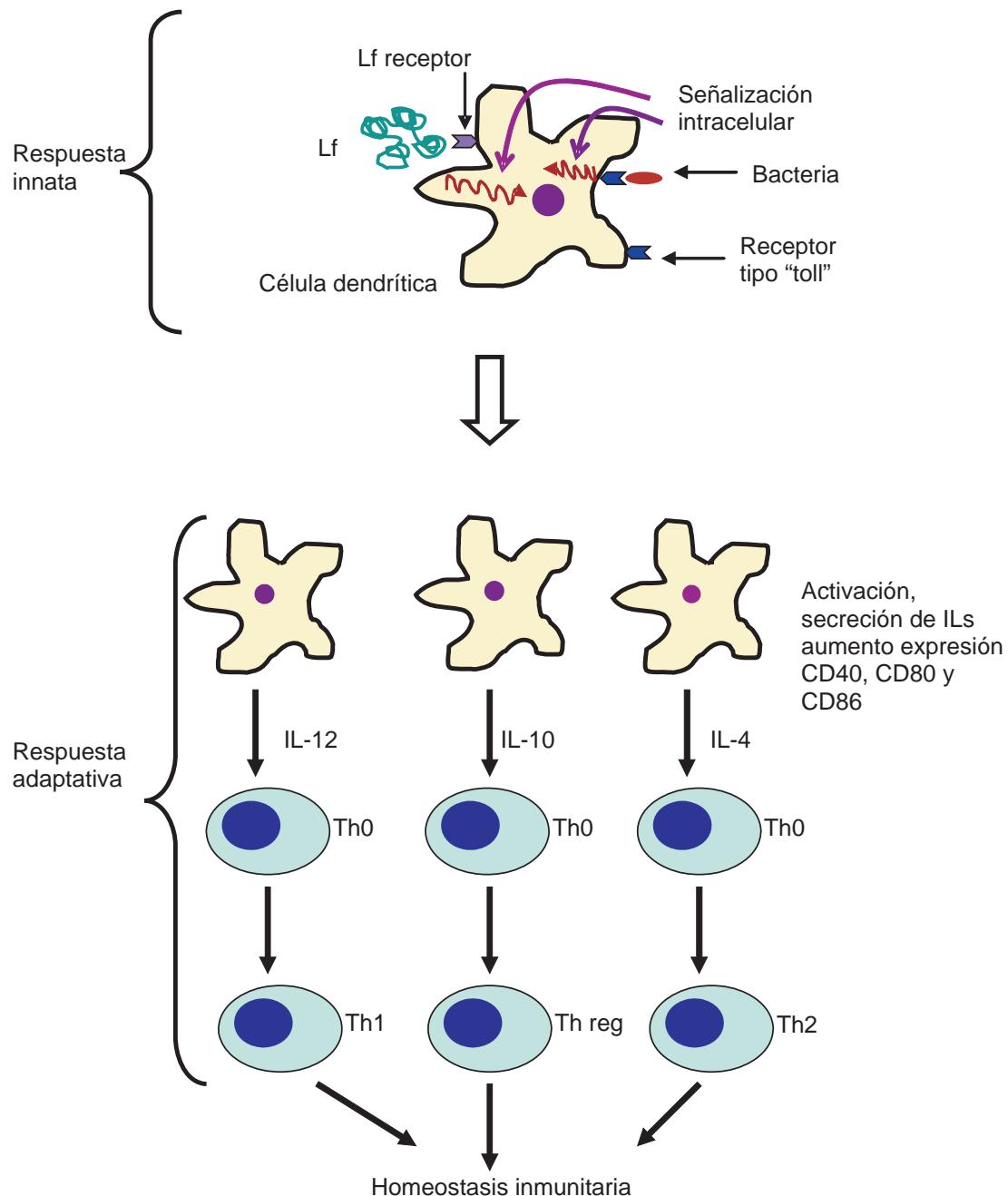
Bacteria	Modelo de infección	Tratamiento con lactoferrina	Efecto	Ref
ETEC [enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ]	Infección sistémica por vía IV* en ratón CFW, CBA.	<sup>§</sup> Lfb 10 mg IV dosis única un día antes de infectar <sup>†</sup>	Aumentó fagocitosis	30-32
ETEC	Infección IG <sup>†</sup> en ratón ICR libres de patógenos	Lfb 10 mg/mL <i>ad libitum</i> en sol. de beber 7 días antes de infectar	Inhibición de adherencia bacteriana intestinal, efecto antimicrobiano	33
<i>E. coli</i> Ec5 (O18:K1:H7) causante de meningitis neonatal en ratas	Infección IG en ratas recién nacidas Sprague Dawley	<sup>  </sup> rLfh 350 mg/kg /día 2 días antes de infectar	Efecto bactericida, activación de macrófagos	34
<i>E. coli</i> O6K5 causante de pielonefritis infantil aguda	Instilación en vejiga urinaria de ratón C3H/Tif, C3H/HeN	500 µg Lfb o Lfh 30 min antes de infectar por vía oral	Inhibición IL-6 efecto: bactericida, antiinflamatorio	35
<i>Shigella flexneri</i>	Infección ig en conejo New Zealand	Lfh 0.125 mM <i>ad lib</i> en PBS para beber, después de infectar	Protección vs inflamación por enteritis aguda	36
<i>Helicobacter pylori</i>	Infección oral en ratón C57BL/6	Lfb 4 mg/0.1 mL/día por 3 semanas, 4 semanas después de infectar	Efecto antibacteriano, reducción de carga bacteriana	37
<i>H. pylori</i>	Infección IG en ratón BALB/Ca	Lfb 400 mg/kg diarios por 10 días, 4 semanas después de infectar	Inhibición de colonización, efecto antiinflamatorio	38
<i>Staphylococcus aureus</i> uropatógena	Infección IV en ratón NIH/PLCR	Lfb 1 mg IV antes de infectar	Protección vs colonización, inflamación	39
<i>Listeria monocytogenes</i>	Infección oral en ratón BALB/c	En el dia 4 después de infectar, Lfh 10 y 100 mg/kg por 7 días	Protección vs colonización hepática, necrosis, inflamación	40
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Reto nasal con aerosol en ratón deficiente del gene $\beta$ -2 <i>microglobulina</i>	Lfb, Lfh, 1 mg por ratón, post-infec, 2 veces/1 semana IN <sup>‡</sup>	Bacteriostasis, susceptibilidad disminuida	41

\*IV: vía intravenosa, <sup>†</sup>IG: vía intragástrica, <sup>‡</sup>IN: vía intranasal, <sup>§</sup>Lfb: lactoferrina bovina, <sup>||</sup>rLfh: lactoferrina recombinante humana.



**Figura 1.** Modelo de modulación de la inflamación y respuesta inmune celular de lactoferrina a través de su interacción con receptores (basado de: Legrand D et al.).<sup>11,12</sup> (Lado izquierdo) Como resultado de su interacción con lactoferrina (Lf), el lipopolisacárido (LPS) no se une al receptor de membrana CD14 y por ende, su unión extracelular con el TLR-4 se bloquea. En ausencia de interacción LPS-TLR-4, no ocurre la señalización intracelular bioquímica que genera la activación de factores proteínicos de transcripción, como el NF $\kappa$ B. Este último, está implicado en la expresión génica de mediadores pro-inflamatorios como el TNF e IL-1. (Centro) Los PGs facilitan la unión de la Lf con otros receptores como proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRPs) y nucleolina. La unión de la Lf a LRP favorece su endocitosis y/o la activación de vías de señalización intracelular. La interacción de la Lf con nucleolina favorece su endocitosis e interacción nuclear. Una vez endocitada la nucleolina puede emerger a la superficie celular.

- Unión de Lf con LPS; unión directa o vía PGs de Lf con receptores
- Bloqueo de unión
- ..... Bloqueo de señalización intracelular
- ..... Señalización intracelular activada por la unión extracelular de Lf con receptores
- - Endocitosis e interacción de Lf con ADN
- - Endocitosis e interacción nuclear de Lf vía nucleolina; reciclaje membrana-núcleo-membrana de nucleolina



**Figura 2.** Interacción de lactoferrina vía receptor con células dendríticas y su repercusión en la regulación inmunitaria en condiciones de infección (basado de Kreuzel ML y col.).<sup>48</sup> Este modelo simplifica la complejidad de interacciones que ocurren *in vivo* entre componentes con un papel clave de enlace entre la inmunidad innata y adaptativa como son: la lactoferrina y las células dendríticas (CDs). Al unirse a receptores de superficie de las CDs, la lactoferrina induciría vías de señalización intracelular que podrían estar en conexión con otras vías activadas como resultado de la unión entre receptores tipo toll (*toll like receptors* [TLRs]) y componentes de bacterias. La activación de señales intracelulares vía TLRs en CDs, induce la expresión de interleucinas (ILs) y de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86, críticamente relevantes en la activación de linfocitos T y por tanto en la respuesta adaptativa. Dependiendo del tipo de agente infeccioso y del *status fisiológico* del hospedero, las CDs podrían madurar y expresar IL-12, IL-10 e IL-4 requeridas para la diferenciación de linfocitos Th0 en: Th1, Th reg y Th2, respectivamente. La adecuada activación de las subpoblaciones de linfocitos y producción de ILs conduciría a la generación de la respuesta inmunitaria necesaria para el control de la infección y la homeostasis.

sobrenadantes de cultivos celulares de placas de Peyer y de bazo estimulados *in vitro* con Lfb o LPS. En tanto, la Lfb suministrada *ad libitum* en el agua de beber no tuvo ningún efecto. Todas las modalidades mencionadas, excepto la dosis continua de Lfb disuelta en el agua de beber, promovieron la proliferación de células de bazo estimuladas *in vitro* con Lfb o ConA.<sup>8</sup>

A nivel sistémico, la Lfb suministrada a ratones sanos por vía i.g. por un día, promovió en sangre periférica el incremento de diversas células como leucocitos, granulocitos, linfocitos T  $\gamma/\delta$  así como de linfocitos Th CD3+CD4+.<sup>5</sup> Así mismo, la capacidad de la Lfb de estimular la proliferación de los linfocitos TCD4+ ha sido detectada en cultivos celulares de placas de Peyer y bazo de ratones inmunizados por vía i.g. con Lfb.<sup>9</sup> Como en la generación de anticuerpos, el tipo de administración oral y la forma en que la lactoferrina es administrada influyen fuertemente no sólo en la proliferación de los linfocitos, sino incluso en la diferenciación de las subpoblaciones Th1 y Th2,<sup>8</sup> implicadas en la regulación de la respuesta inmune celular y humoral, respectivamente. En ratones sanos, la ingestión continua de Lfb adicionada en el alimento, o en una dosis diaria administrada por vía bucal o i.g., promovieron una respuesta tipo Th2. Esta última, se relacionó con la formación de IgG1 e IgA en suero y secreciones intestinales así como de IL-4 e IL-5 en sobrenadantes de cultivos de placas de Peyer y bazo estimulados *in vitro* con Lfb o ConA.<sup>8</sup> Sólo la vía oral menos natural es decir, la intubación i.g., estimuló una respuesta humoral tipo Th1, evidente por la generación de anticuerpos IgG2a en secreciones y suero así como de IFN- $\gamma$  e IL-2 en células de bazo estimuladas con Lfb o ConA. La Lfb suministrada libremente en el agua de beber no tuvo ningún efecto sobre la respuesta Th1/Th2.

La falta de respuesta Th1/Th2 se asoció a la inducción de tolerancia inmunológica por vía oral causada por la persistencia de lactoferrina en fluidos biológicos al ser ingerida diariamente en el agua de beber.<sup>8</sup> El efecto tolerogénico de la Lfb ha sido observado con proteínas ingeridas frecuentemente en el agua de beber como la ovoalbúmina que suprime la respuesta inmunitaria en placas de Peyer y bazo a través de la tolerancia de tipo Th2.<sup>8</sup>

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 I  $\alpha$  y  $\beta$  que potencian la actividad citotóxica de linfocitos T y células NK).<sup>6</sup> También se ha descrito que la Lfb no induce la proliferación de linfocitos intraepiteliales

(*intraepithelial lymphocytes [IEL]*) ni de ganglios mesentéricos linfoides (*mesenteric lymphoid nodules [MLN]*) de las subpoblaciones T CD3+, TCD3+  $\gamma/\delta$ , T CD4-CD8+ y CD4+CD8-.<sup>10</sup> En contraste, la Lfb promueve la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 en cultivos de IEL estimulados con anticuerpos anti-cadena  $\beta$  del receptor de linfocitos T (*T cell receptor [TCR]*) y anti-CD3, respectivamente;<sup>10</sup> por el contrario, Lfb no favoreció la producción de IFN- $\gamma$  en IEL estimulados con anticuerpos anti-TCR  $\gamma/\delta$ , esto indicó que la Lfb sólo afectó la producción de INF- $\gamma$  de linfocitos T  $\alpha/\beta$  de origen tímico. En cultivos celulares de MLN estimulados con anti-CD3, la lactoferrina propició la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10. Estos resultados muestran que la lactoferrina es capaz de promover la respuesta de linfocitos Th1, Th2 y de linfocitos Th reguladores (Th reg) de origen tímico.<sup>10</sup> Para algunos, el efecto de la lactoferrina sobre la respuesta linfocitaria depende del *status* de maduración y de activación de las subpoblaciones Th1/Th2.<sup>9</sup>

Estas evidencias experimentales sugieren que el efecto inmunorregulador de la lactoferrina podría radicar no sólo en su capacidad de alterar la diferenciación y proliferación de las subpoblaciones Th1/Th2,<sup>9</sup> sino también influir en la función de los linfocitos Th reg. Estos últimos, están involucrados en modular la actividad de los linfocitos efectores Th1/Th2 para mantener la homeostasis a través de la secreción de IL-10 y del factor transformante de crecimiento  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$  [TGF- $\beta$ ]*).<sup>16,17</sup>

Estudios de absorción y digestibilidad intestinal han aportado información sobre el destino y efectos de la Lfb administrada por vía oral. Al ser ingerida, la Lfb modula la respuesta inmunitaria a nivel local y sistémico de células inmunocompetentes del epitelio intestinal y del tejido linfoide asociado a mucosas.<sup>18</sup> El modelo anterior asume que la mayor proporción de Lfb ingerida no es transferida a la sangre<sup>19</sup> y sobrevive al efecto de proteasas del aparato gastrointestinal, como se demostró en ratones<sup>15</sup> y voluntarios humanos.<sup>20</sup> Otra hipótesis de modulación a nivel sistémico<sup>7</sup> sugiere que la lactoferrina ingerida es absorbida en el intestino y transportada a través de la sangre a órganos linfoides secundarios como bazo y ganglios periféricos, donde actúa sobre células inmuncocompetentes. La presencia de Lfb oral transportada en la sangre a través de la circulación linfática<sup>21</sup> podría apoyar la factibilidad de este modelo.

Aunque una gran proporción de lactoferrina persiste en el tracto gastrointestinal, no se puede ignorar la presencia de lactoferricina (Lfcn), un péptido bioactivo generado *in vivo* en el tracto gastrointesti-

nal a partir de la acción proteolítica de la pepsina sobre la Lfb<sup>22,23</sup> o Lfh.<sup>24</sup> La Lfcn deriva de un segmento del extremo N1 terminal de la lactoferrina, en donde reside la actividad antimicrobiana de esta última. A diferencia de la lactoferrina, la Lfcn carece de actividad quelante de iones Fe<sup>3+</sup>, pero tiene actividades inmunorreguladoras análogas a las de la lactoferrina parental,<sup>25</sup> como su capacidad de estimular la proliferación celular. En cultivos celulares de bazo y placas de Peyer de ratones atípicos tratados oralmente con hidrolizados de lactoferrina se observó una respuesta celular proliferativa de los linfocitos B.<sup>26</sup> El estudio *in vivo* de estos derivados proteolíticos podría ayudar a esclarecer su contribución al efecto inmunorregulador de la lactoferrina.

Otro aspecto cuyo estudio es preciso evaluar en condiciones *in vivo* es la interacción de lactoferrina con receptores de la membrana celular y su repercusión sobre la regulación inmunitaria. Se ha propuesto que a través de su unión a receptores, la lactoferrina modifica la expresión de genes implicados en la activación, diferenciación, proliferación celular y secreción de citocinas.<sup>12</sup> Se ha sugerido que la lactoferrina tiene un efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria al unirse a componentes bacterianos pro-inflamatorios como el LPS e inhibir la interacción de este último, con la proteína sérica de unión a LPS (*LPS binding protein [LBP]*). El LPS unido a la LBP es captado por el receptor CD14 de membrana CD14 (mCD14) que lo transfiere a la proteína MD2 la cual facilita su unión con el receptor tipo *toll* (de peaje) (*toll like receptor [TLR-4]*). La interacción LPS-TLR-4 induce la señalización intracelular que conduce a la activación de factores de transcripción como el factor nuclear κB (*nuclear factor κB [NFκB]*). El NFκB está implicado en la regulación de la expresión de genes que codifican mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor [TNF]*) e IL-1.<sup>27</sup> 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 los receptores mCD14 y finalmente con el TLR-4.<sup>11</sup> La influencia de la lactoferrina en la señalización a través de TLR-4 se ha explorado en cultivos de macrófagos peritoneales obtenidos de ratones con alelo funcional TLR-4 y de ratones con alelo mutante TLR-4 incubados con LPS o Lfb. Al igual que el LPS, la lactoferrina indujo la expresión de CD40 en macrófagos de ratones con TLR-4 funcional pero a diferencia del LPS, la lactoferrina estimuló la expresión de IL-6 en macrófagos de ratones con alelo

mutante TLR-4. Estos resultados sugieren que la lactoferrina induce la expresión de CD40 e IL-6 por una vía de señalización dependiente e independiente del TLR-4, respectivamente.<sup>28</sup>

Además de estar implicada en la señalización intracelular, como resultado de su unión a receptores de superficie, la lactoferrina ha sido considerada como factor regulador de la transcripción al interactuar con receptores que favorecen su endocitosis y contacto con núcleo. El receptor de la lactoferrina expresado en el epitelio intestinal<sup>12</sup> conocido como lectina, es una proteína asociada a balsas lipídicas y anclada a la membrana mediante el glicosilfosfatidil inositol (GPI) implicada en la endocitosis y en favorecer así la internalización de la lactoferrina hacia el núcleo.<sup>29</sup> La lactoferrina también posee otros receptores distribuidos ampliamente en células y tejidos como son los proteoglicanos (PGs), nucleolina y proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoprotein receptor-related proteins [LRPs]*).<sup>12</sup> Los PGs son receptores de baja afinidad pero mayoritariamente responsables de la alta densidad de unión de la lactoferrina sobre la superficie celular. Los PGs facilitan la unión de la lactoferrina con otros receptores como LRPs y nucleolina. Se ha sugerido que los LRPs inducen la activación de vías de señalización intracelular al interactuar extracelularmente con la lactoferrina y favorecen su endocitosis. La nucleolina es una proteína nuclear pero que también puede expresarse en la superficie celular, implicada en la endocitosis de la lactoferrina y en favorecer su contacto con el núcleo.<sup>12</sup>

Evidencias obtenidas en cultivos de células mononucleares, muestran que al endocitarse vía receptor, la lactoferrina bloquea la unión del NFκB al promotor de TNF y de este modo inhibe la producción de citocinas proinflamatorias inducidas por el LPS.<sup>12</sup> Además de interactuar y afectar la expresión de genes al ser endocitada, la lactoferrina activa vías de señalización al unirse a receptores expresados en la superficie celular. A través de este último mecanismo, la lactoferrina estimula a las proteincinasas activadas por mitógeno (*mitogen activated protein kinases [MAPKs]*) implicadas en la expresión de CD4 en linfocitos T de la línea celular Jurkat.<sup>12</sup>

Se ha propuesto que los efectos positivos, o negativos, de la lactoferrina sobre la expresión de genes resultan de su actividad inmunomoduladora dependiente del estado fisiológico del hospedero.<sup>12</sup> En la figura 1 se ilustra el modelo de modulación de la inflamación y la respuesta inmune celular de lactoferrina a través de su interacción con receptores.

## Influencia de la lactoferrina heteróloga sobre la respuesta inmunitaria en infecciones bacterianas

Varios modelos animales con infección experimental (*Cuadro I*) apoyan algunos efectos terapéuticos o profilácticos de la lactoferrina administrada por vía oral o parenteral, contra infecciones o inflamación de origen infeccioso. La protección atribuida a la lactoferrina heteróloga involucra efectos como la supervivencia del hospedero, reducción del número de patógenos en tejidos y contribución a la resolución de los síntomas, entre otros.

La influencia de la Lfb en la protección ha sido asociada a su actividad bacteriostática, como se demostró *in vivo* en el intestino de ratones inoculados oralmente con algunas especies de *Clostridium* de la microflora fecal.<sup>42</sup> Se ha propuesto que mediante su acción bacteriostática, la Lfb suprime la translocación intestinal de enterobacterias endógenas de la flora normal del tracto gastrointestinal hacia los ganglios mesentéricos y al compartimiento sistémico.<sup>43</sup> En ratones libres de patógenos específicos (*specific pathogen free [SPF]*) alimentados con Lfb adicionada en leche, se observó un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de enterobacterias intestinales. La bacteriostasis ejercida por la Lfb dependió de su habilidad de estimular la absorción intestinal de carbohidratos y así disminuir su disponibilidad para enterobacterias cuyo crecimiento depende de la concentración de azúcares en la dieta.<sup>44</sup> En otro modelo de infección, la acción quelante de la lactoferrina sobre el hierro influyó en la inhibición del crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>41</sup> A través de este efecto bacteriostático, la lactoferrina disminuyó *in vivo* la infección por *M. tuberculosis* en el pulmón de ratones altamente susceptibles que carecen del gene  $\beta$ -2-microglobulina.<sup>41</sup> En el modelo murino de infección con ETEC (*enterotoxigenic Escherichia coli*) cuya patogénesis depende de su habilidad de adherirse y colonizar el intestino, la protección conferida por la lactoferrina oral se debió a su capacidad de bloquear la adherencia bacteriana intestinal.<sup>33</sup>

En ratones infectados por instilación en la vejiga, o vía intravenosa, con especies uropatógenas de *E. coli*<sup>35</sup> y *Staphylococcus*<sup>39</sup> respectivamente, se sugirió que el efecto protector de la lactoferrina contra infecciones en vías urinarias podría estar vinculada con su actividad bactericida ejercida al unirse a componentes aniónicos de la membrana externa, o pared celular, y de ese modo desestabilizar la superficie bacteriana.

En modelos de infección sistémica<sup>32</sup> o intestinal,<sup>34</sup> con cepas patógenas de *E. coli*, la protección exhibida por la lactoferrina se atribuyó a su capacidad de unirse a células fagocíticas y estimular su acción bactericida. La interacción directa con bacterias, o células fagocíticas, junto con la respuesta del hospedero, pueden formar parte del conjunto de eventos multifactoriales que contribuyen al efecto protector de la lactoferrina.<sup>9</sup> Lo anterior se ve reflejado en la protección atribuida a la Lfb o Lfh, administradas por vía oral, contra infecciones extraintestinales que ocurren a nivel hepático,<sup>40</sup> sistémico<sup>39</sup> y renal.<sup>35</sup>

Algunos estudios experimentales han analizado los efectos de la lactoferrina sobre la respuesta de linfocitos T e ILs implicados en la protección contra infecciones causadas por bacterias patógenas.<sup>9,13,45</sup> En infecciones bacterianas extraintestinales acompañadas de una fuerte respuesta inflamatoria, se demostró que la Lfb o Lfh ejercen un efecto antiinflamatorio protector al reducir la producción de la citocina IL-6 y del TNF<sup>32,35</sup> así como la expresión de ARNm para TNF, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ .<sup>40</sup> Otros modelos de infección muestran que la lactoferrina favorece la polarización de la respuesta mediada por linfocitos Th1, que tienen un papel central en el control de infecciones causadas por *M. tuberculosis*. El incremento de la respuesta Th1 reflejado por el aumento de citocinas proinflamatorias IL-12, TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6, se observó en ratones inmunizados con la vacuna BCG adicionada con lactoferrina como adyuvante, e infectados con *M. tuberculosis*.<sup>46</sup> La polarización hacia la respuesta Th1 también se observó en ratones transgénicos para el gene *lfh* e infectados con *Staphylococcus aureus*, causante de artritis séptica. En estos ratones, la Lfh redujo la infección sistémica, artritis y mortalidad, al estimular la inmunidad celular y la producción de TNF, IFN- $\gamma$ , asociados a la respuesta de tipo Th1 así como de inhibir la producción de IL-5 e IL-10 de las células Th2.<sup>47</sup>

La influencia de la lactoferrina sobre la protección contra infecciones e inflamación, está relacionada con su capacidad de participar en la maduración y diferenciación de linfocitos Th1/Th2 y por ende, en el balance de citocinas. Se ha sugerido que la lactoferrina inhibe la producción de citocinas tipo Th1 y así limita las consecuencias negativas de una excesiva respuesta inflamatoria asociada a infecciones causadas por diversas bacterias patógenas. Por otra parte, la lactoferrina promueve la respuesta Th1 en infecciones cuyo control depende de las citocinas producidas por esta subpoblación.<sup>9</sup>

Un modelo propuesto (*Figura 2*) sugiere que la lactoferrina es un componente de la respuesta innata

que podría interaccionar con células dendríticas (CDs) para activar vías de señalización involucradas en la producción de ILs que afectan la diferenciación de subpoblaciones de linfocitos T.<sup>48</sup> Las CDs son células presentadoras de antígeno que funcionan como eslabón entre la respuesta innata y la adaptativa. Las CD expresan moléculas esenciales en la respuesta innata como son los TLRs que interaccionan con componentes microbianos. Dicha interacción induce la activación y expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 que tienen un papel relevante en la presentación de antígenos hacia los linfocitos T para la generación de la inmunidad adaptativa.<sup>49</sup> En el modelo ilustrado en la figura 2 se propone que, dependiendo de la naturaleza del agente infeccioso y del *status* fisiológico del hospedero, las CD promueven la activación de los linfocitos en Th1, Th y/o Th2 al expresar IL-12, IL-10 e IL-4, respectivamente.<sup>48</sup> La activación de las subpoblaciones de linfocitos y la producción de ILs requeridas para determinado patógeno, conduciría al control de la infección hasta alcanzar la homeostasis inmunitaria.

Evidencias obtenidas en ensayos *in vitro* muestran que la Lfh obtenida de leche materna y la lactoferrina endógena liberada por neutrófilos redujeron la producción de IFN- $\gamma$  y aumentaron la de IL-10 en linfocitos Th CD4+.<sup>50</sup> Otros ensayos reportan que al favorecer la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad en macrófagos, la lactoferrina estimula su capacidad de presentar antígenos y activar a linfocitos Th1 secretores de IL-12.<sup>51</sup> Aún falta esclarecer si estos eventos están implicados en la regulación ejercida por la lactoferrina heteróloga sobre la respuesta de linfocitos Th y el balance de citocinas que opera en condiciones *in vivo*.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los modelos animales de infección experimental han permitido ponderar algunos efectos antibacterianos de la lactoferrina heteróloga con potenciales aplicaciones terapéuticas para infecciones bacterianas en humanos. La efectividad terapéutica de la Lfb ha sido probada para el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes humanos portadores.<sup>52</sup> En comparación con la Lfb, la Lfh recombinante no exhibe actividad terapéutica eficiente para erradicar *H. pylori* del intestino de pacientes infectados.<sup>53</sup> Otra estrategia terapéutica que se probó en individuos infectados con *H. pylori* de población abierta y elegidos al azar, fue la administración conjunta de lactoferrina y antibióticos. En este estudio, se observó que la

Lfb reforzó la actividad de fármacos antimicrobianos aplicados para la erradicación de *H. pylori* tales como esomeprazol, claritromicina y tinidazol.<sup>54</sup>

Los efectos reguladores de la lactoferrina sobre componentes humorales y celulares de la respuesta inmunitaria se han valorado en voluntarios humanos sanos tratados por vía oral con cápsulas de lactoferrina comercial. En estos pacientes, la lactoferrina incrementó transitoriamente los neutrófilos inmaduros circulantes y atenuó la producción espontánea de IL-6 y TNF en cultivos de sangre periférica.<sup>55,56</sup> Para evaluar el efecto inmunorregulador, los voluntarios tratados con lactoferrina se separaron en diferentes grupos de acuerdo a la habilidad de sus células mononucleares sanguíneas de producir IL-6 y TNF en forma espontánea o en presencia de LPS. La lactoferrina favoreció la disminución o el aumento de IL-6 y TNF en individuos que mostraron un alto y bajo nivel de respuesta, respectivamente.<sup>55,56</sup> Estos resultados sugieren que el efecto regulador de la lactoferrina depende del estado inmune de los individuos y podría ayudar a mantener la homeostasis inmunitaria en condiciones de salud o en infección.

Otra implicación práctica del efecto inmunorregulador de la lactoferrina incluye su aplicación terapéutica, o profiláctica, como agente antiinflamatorio que acompaña a una variedad de infecciones bacterianas. A nivel experimental se ha valorado la efectividad antiinflamatoria de Lfb formulada en liposomas administrada por vía oral a ratones. En comparación con la Lfb libre, la Lfb en forma de liposomas exhibió mayor efecto supresor sobre la producción de TNF- $\alpha$  en células mononucleares sanguíneas estimuladas *in vitro* con LPS.<sup>57</sup> Además de los liposomas, los formulados entéricos de Lfb probados en ratas<sup>58</sup> podrían representar otra alternativa para aumentar su efectividad antiinflamatoria. Estos formulados son absorbidos eficientemente en el intestino y refuerzan la resistencia de la lactoferrina a la proteólisis enzimática.

Por su acción inmunomoduladora, la lactoferrina tiene una probable aplicación como adyuvante de vacunas. La búsqueda de adyuvantes eficientes e inocuos para su aplicación en humanos ha estimulado el interés por explorar las propiedades adyuvantes de la lactoferrina. En ratones se observó que la lactoferrina coadministrada por vía oral, peritoneal o subcutánea con antígenos particulados como glóbulos rojos de carnero (GRC), BCG, o antígenos proteínicos solubles como ovoalbúmina (OVA), promovió la respuesta de hipersensibilidad tardía antígeno-específica de nivel similar al observado con el adyuvante completo

de Freund.<sup>59</sup> Al explorar el potencial para estimular la respuesta humoral y celular hacia OVA y GRC en ratón, se observó que el efecto adyuvante de la lactoferrina en forma de complejo con monofosforil lípido A (MPL) fue mayor que de cada uno por separado.<sup>60</sup>

Como en el caso de otros productos farmacéuticos, el riesgo tóxico potencial de la administración de lactoferrina heteróloga también ha sido valorado. Los resultados obtenidos en ensayos experimentales muestran que la administración de Lfb<sup>61</sup> y Lfh recombinante<sup>62</sup> en ratas no producen efectos adversos. Aun cuando la Lfb y Lfh son productos de baja toxicidad existen algunas desventajas que conllevan su aplicación. En algunas infecciones la lactoferrina podría estimular el crecimiento de bacterias capaces de captar el hierro a través de receptores de membrana para lactoferrina, como en el caso de *Neisseria meningitidis* y *Moraxella catarrhalis*, entre otras.<sup>63</sup> Teóricamente la lactoferrina podría favorecer respuestas autoinmunitarias en pacientes que padecen tuberculosis o lepra. Estos pacientes producen autoanticuerpos de reactividad cruzada contra lactoferrina endógena que reconocen a una proteína de 65 kDa de choque térmico producida por los bacilos *M. tuberculosis* y *M. leprae*.<sup>64</sup>

Aunque gran parte de los eventos sobre la influencia de la lactoferrina en la respuesta inmunitaria aún son poco conocidos, las propiedades multifuncionales de la lactoferrina y su papel en la homeostasis inmunitaria están siendo estudiadas extensivamente por sus implicaciones clínicas.<sup>48,65</sup> La comprensión global de los eventos sustantivos involucrados en la modulación mediada por la lactoferrina, así como sus potenciales efectos adversos, será fundamental para su racional y eficiente aplicación en estrategias de prevención, o tratamiento de infecciones causadas por bacterias patógenas.

## REFERENCIAS

- Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: A general review. *Hematologica*. 1995; 80: 252-67.
- Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol*. 2002; 80: 95-102.
- Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*. 2004; 17: 189-96.
- Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev*. 1992; 56: 395-411.
- Wakabayashi H, Takakura N, Yamauchi K, Tamura Y. Modulation of immunity related gene expression in small intestines of mice by oral administration of lactoferrin. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13: 239-45.
- Kuhara T, Yamauchi K, Tamura Y, Okamura H. 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*. 2006; 26: 489-99.
- Debbabi H, Dubarry M, Rautureau M, Tome D. Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic responses in mice. *J Dairy Res*. 1998; 65: 283-93.
- 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: 403-9.
- Fisher R, Debbabi H, Dubarry M, Boyaka P, Tomé D. Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin. *Biochem Cell Biol*. 2006; 84: 303-11.
- Takakura N, Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Influences of orally administered lactoferrin on IFN-γ and IL-10 production by intestinal intraepithelial lymphocytes and mesenteric lymph-node cells. *Biochem Cell Biol*. 2006; 84: 363-8.
- Legrand D, Elass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62: 2549-59.
- Legrand D, Elass E, Carpentier M, Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol*. 2006; 84: 282-90.
- Yamauchi K, Wakabayashi H, Shin K, Takase M. Bovine lactoferrin: benefits and mechanisms of action against infections. *Biochem Cell Biol*. 2006; 84: 291-6.
- Weinberg ED. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. *J Pharm Pharmacol*. 2001; 53: 1303-10.
- Fisher R, Debbabi H, Blais A, Dubarry M, Rautureau M, Boyaka P, et al. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues. *Int Immunopharmacol*. 2007; 7: 1387-93.
- Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. *J Med*. 2006; 64: 4-9.
- Cai G, Kastelein RA, Hunter CA. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur J Immunol*. 1999; 29: 2658-65.
- Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem Cell Biol*. 2002; 80: 109-12.
- Wakabayashi H, Kuwata H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y. No detectable transfer of dietary lactoferrin or its functional fragments to portal blood in healthy adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004; 68: 853-60.
- Troost F, Steijens J, Saris WHM, Brummer RJM. Gastric digestion of bovine lactoferrin *in vivo* in adults. *J Nutr*. 2001; 131: 2101-4.
- Takeuchi T, Kitagawa H, Harada E. Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp Physiol*. 2004; 89: 263-70.
- Kuwata H, Yip TT, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H, Tomita M, et al. The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice. *Biochem J*. 1998; 334(Pt 1): 321-3.
- Kuwata H, Yip TT, Tomita M, Hutchens TW. Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1429: 129-41.

24. Troost F, Saris WHM, Brummer RJM. Orally ingested human lactoferrin is digested and secreted in the upper gastrointestinal tract *in vivo* in women with ileostomies. *J Nutr.* 2002; 132: 2597-2600.
25. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: a lactoferrin derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 2588-98.
26. 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.* 1997; 80: 2330-9.
27. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 816-25.
28. Curran CS, Demick KP, Mansfield JM. Lactoferrin activates macrophages via TLR4 dependent and independent signaling pathways. *Cell Immunol.* 2006; 242: 23-30.
29. Wrackmeyer U, Hansen GH, Seya T, Danielsen EM. Intelectin: a novel lipid raft associated protein in the enterocytes brush border. *Biochemistry.* 2006; 45: 9188-97.
30. Zagulski T, Lipiński P, Zagulska A, Broniek S, Jarząbek Z. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo*. *Br J Exp Path.* 1989; 70: 687-704.
31. Zagulski T, Lipiński P, Zagulska A, Jarząbek Z. Antibacterial system generated by lactoferrin in mice *in vivo* is primarily a killing system. *Int J Exp Path.* 1998; 79: 117-23.
32. Zimecki M, Artym J, Chordazek G, Kocieba M, Kruzel ML. Protective effects of lactoferrin in *Escherichia coli* induced bacteremia in mice: relationship to reduced serum TNF alpha level and increased turnover of neutrophils. *Inflamm Res.* 2004; 53: 292-6.
33. Kawasaki Y, Tazume S, Shimizu K, Matsuzawa H, Dosako S, Isoda H, et al. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of *Escherichia coli* to host cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64: 348-54.
34. Edde L, Hipolito RB, Hwang FF, Headon DR, Shalwitz RA, Sherman MP. Lactoferrin protects neonatal rats from gut related systemic infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281: G1140-50.
35. Häversen LA, Engberg I, Baltzer L, Dolphin G, Hanson LÅ, Mattsby-Baltzer I. Human lactoferrin and peptides derived from a surface exposed helical region reduce experimental *Escherichia coli* urinary tract infection in mice. *Infec Immun.* 2000; 68: 5816-23.
36. Gomez HF, Ochoa TJ, Herrera-Insua I, Carlin LG, Cleary TG. Lactoferrin protects rabbits from *Shigella flexneri* induced inflammatory enteritis. *Infect Immun.* 2002; 70: 7050-3.
37. Dial EJ, Hall LR, Serna H, Romero JJ, Fox JG, Lichtenberger LM. Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci.* 1998; 43: 2750-6.
38. Wang X, Hirno S, Willén R, Wadström T. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 430-5.
39. Bhimani RS, Vendrov Y, Furmanski P. Influence of lactoferrin feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice. *J Appl Microbiol.* 1999; 86: 135-44.
40. Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee BH, et al. Potential antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with *Listeria monocytogenes*. *J Med Microbiol.* 2005; 54(Pt 11): 1049-54.
41. Schaible UE, Collins HL, Priem F, Kaufmann SH. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J Exp Med.* 2002; 196: 1507-13.
42. Teraguchi S, Shin K, Ozawa K, Nakamura S, Fukuwatari Y, Tsuyuki S, et al. Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of *Clostridium* species in the gut of mice fed bovine milk. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 501-6.
43. Teraguchi S, Shin K, Ogata T, Kingaku M, Kaino A, Miyauchi H, et al. Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 4131-4.
44. Ogata T, Teraguchi S, Shin K, Kingaku M, Fukuwatari Y, Kawase K, et al. The mechanism of *in vivo* bacteriostasis of bovine lactoferrin. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 443: 239-46.
45. Teraguchi S, Wakabayashi H, Kuwata H, Yamauchi K, Tamura Y. Protection against infections by oral lactoferrin: Evaluation in animal models. *Biometals.* 2004; 17: 231-4.
46. Hwang SA, Kruzel ML, Actor JK. Lactoferrin augments BCG vaccine efficacy to generate T helper response and subsequent protection against challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Int Immunopharmacol.* 2005; 5: 591-9.
47. Guillén C, McInnes IB, Vaughan DM, Kommajosula S, Van Berkel PHC, Leung BP, et al. Enhanced Th1 response to *Staphylococcus aureus* infection in human lactoferrin transgenic mice. *J Immunol.* 2002; 168: 3950-7.
48. Kruzel ML, Actor JK, Boldogh I, Zimecki M. Lactoferrin in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw* (on line). 2007; 61: 261-7.
49. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004; 5: 987-95.
50. Li KJ, Lu MC, Hsieh SC, Wu CH, Yu HS, Tsai CY, et al. Release of surface-expressed lactoferrin from polymorphonuclear neutrophils after contact with CD4+ T cells and its modulation on Th/Th2 cytokine production. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 350-8.
51. Wilk KM, Hwang SA, Actor JK. Lactoferrin modulation of antigen presenting cell response to BCG infection. *Postepy Hig Med Dosw* (online). 2007; 61: 277-82.
52. Okuda M, Nakazawa T, Yamauchi K, Miyashiro E, Koizumi R, Booka M, et al. Bovine lactoferrin is effective to suppress *Helicobacter pylori* colonization in the human stomach: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Chemother.* 2005; 11: 265-9.
53. Guttner Y, Windsor HM, Viiala CH, Marshall BJ. Human recombinant lactoferrin is ineffective in the treatment of human *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003; 17: 125-9.
54. Di Mario F, Aragona G, Dal Bo N, Cavallaro L, Marcon V, Olivieri P, et al. Bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication: an open, randomized, multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 23: 1235-40.
55. Zimecki M, Właszczyk A, Cheneau P, Brunel AS, Mazurier J, Spik G, et al. Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. *Arch Immunol Ther Exp.* 1998; 46: 231-40.
56. Zimecki M, Spiegel K, Właszczyk A, Kubler A, Kruzel ML. Lactoferrin increases the output of neutrophil precursors and attenuates the spontaneous production of TNF-alpha and IL-6 by peritoneal blood cells. *Arch Immunol Ther Exp.* 1999; 47: 113-8.
57. Ishikado A, Imanaka H, Takeuchi T, Harada E, Makino T. Liposomalization of lactoferrin enhanced it's anti-inflam-

- matory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 1717-21.
58. Takeuchi T, Jyonotsuka T, Kamemori N, Kawano G, Shimizu H, Ando K, et al. Enteric formulated lactoferrin was more effectively transported into blood circulation from gastrointestinal tract in adult rats. *Exp Physiol.* 2006; 91: 1033-40.
59. Zimecki M, Kruzel ML. Systemic or local co-administration of lactoferrin with sensitizing dose of antigen enhances delayed type hypersensitivity in mice. *Immunol Lett.* 2000; 74: 183-8.
60. Chodaczek G, Zimecki M, Lukasiewics J, Lugowski C. A complex of lactoferrin with monophosphoryl lipid A is an efficient adjuvant of the humoral and cellular immune response in mice. *Med Microbiol Immunol.* 2006; 195: 207-16.
61. Yamauchi K, Toida T, Nishimura S, Nagano E, Kusuoka O, Teraguchi S, et al. Thirteen week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38: 503-12.
62. Appel MJ, van Veen HA, Vietsch H, Salaheddine M, Nuijens JH, Ziere B, et al. Sub-chronic (13 week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 964-73.
63. Ling JML, Schryvers AB. Perspectives on interactions between bacteria and lactoferrin. *Biochem Cell Biol.* 2006; 84: 275-81.
64. Esaguy N, Aguas AP, van Embden JD, Silva MT. Mycobacteria and human autoimmune disease: direct evidence of cross reactivity between human lactoferrin and the 65 kilodalton protein of tubercle and leprosy bacilli. *Infect Immun.* 1991; 59: 1117-25.
65. Kruzel ML, Zimecki M. Lactoferrin and immunological dissonance: clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp.* 2002; 50: 399-410.