

# La suplementación con lactoferrina bovina apoya el sistema inmunológico y la acción antioxidante en hombres humanos sanos

Ann M. Muldera, Paul A. Connellana, Christopher J. Oliverb, Carol A. Morrisa,\* , Lesley M. Stevensona

<sup>a</sup>Center for Phytochemistry and Pharmacology, Southern Cross University, Lismore, NSW 2480, Australia

<sup>b</sup>Blackmores Research Office, Southern Cross University, Lismore, NSW 2480, Australia

Received 27 March 2008; revised 16 May 2008; accepted 16 May 2008

Abstracto.

Los suplementos dietéticos de lactoferrina bovina indican en su literatura que mejoran y apoyan la respuesta del sistema inmunológico a través de sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y antivirales. Nuestro objetivo era investigar más a fondo las posibles propiedades inmunomoduladoras y la actividad antioxidante de un suplemento oral de lactoferrina bovina en humanos. Utilizando un diseño de medidas repetidas intraindividuales, 8 varones sanos de 30 a 55 años, autoadministrados diariamente durante 21 días, una cápsula de placebo durante 7 días, seguido de 100 mg de lactoferrina durante 7 días, seguido de 200 mg de lactoferrina durante 7 días.

Recuento de subconjuntos de linfocitos de sangre periférica, activación de células T, citotoxicidad de células asesinas naturales (NK), niveles de citocinas séricas (factor de necrosis tumoral [TNF]  $\alpha$ , interferón [IFN]  $\gamma$ , interleucina [IL] -2, IL-4, IL-6 e IL-10), y la capacidad sérica hidrófila, lipófila y antioxidante total se midieron repetidamente antes y después de cada suplementación progresiva. Se encontraron aumentos estadísticamente significativos entre los niveles de precomplementación y los niveles después de 200 mg de suplementación en la activación total de células T (medida por CD3 +) (P b .001), activación de células T auxiliares (medida por CD4 +) (P b .001), activación de células T citotóxicas (medida por CD8 +) (P b .001) y capacidad antioxidante hidrófila (P b .05). No se observaron cambios significativos en los otros parámetros medidos. Estos resultados apoyan la propuesta de que los suplementos orales de lactoferrina bovina pueden ser un complemento muy útil para la modulación de la actividad inmunitaria, en particular la activación de las células T y el estado antioxidante.

© 2008 Elsevier Inc. Todos los derechos reservados.

## Introducción

La lactoferrina es una proteína que se encuentra en muchos fluidos corporales, incluido el calostro, la leche [1], las lágrimas, las secreciones nasales, la saliva, las secreciones vaginales y el líquido seminal [2]. Estos fluidos interactúan con el ambiente externo del cuerpo y juegan un papel importante en el sistema inmunológico innato del cuerpo; son la primera línea de defensa del anfitrión. Además, la lactoferrina se produce en niveles elevados en los neutrófilos [3]. Se han atribuido a la lactoferrina una serie de funciones bioactivas fisiológicas que incluyen actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral [4], antiparasitaria [5], antitumoral [6], efectos inmunomoduladores [3,7] y regulación de la absorción de hierro durante la inflamación e infección [8]. Es la capacidad de secuestrar iones férricos libres lo que le da a la lactoferrina sus propiedades antioxidantes potenciales [1]. Numerosos estudios in vitro demuestran la activación de lactoferrina y el apoyo del proceso inmunológico. Los estudios in vivo en ratones refuerzan los efectos inmunomoduladores de la lactoferrina bovina contra una serie de enfermedades que involucran infecciones bacterianas y fúngicas, como *Escherichia coli* [9], *Helicobacter pylori* [10], *Candida albicans* [11] y en la inflamación [12]. y cáncer [13]. Además, una pequeña cantidad de ensayos clínicos han apoyado a la lactoferrina bovina como inmunomodulador mediante la demostración de una mayor actividad fagocítica de

los leucocitos polimorfonucleares [14], disminución de la producción de interleucina (IL) -6 y factor de necrosis tumoral (TNF) -  $\alpha$  en cultivos celulares [15] y apoyo a la erradicación de *Helicobacter pylori* [16], *Trichophyton rubrum* [17] y el tratamiento de la hepatitis C [18].

Según esta evidencia, se informa que los suplementos de lactoferrina bovina tienen la capacidad de respaldar el sistema inmunológico e influir en la actividad de las células inmunitarias potencialmente a través de estas propiedades antioxidantes, antibacterianas y antivirales.

El objetivo de este estudio fue, por lo tanto, investigar los cambios en el estado inmunológico y antioxidante, en particular el recuento de subconjuntos de linfocitos, citotoxicidad de células asesinas naturales (NK), activación de células T, citocinas séricas IL-2, TNF- $\alpha$ , interferón (IFN) - $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10 y estado antioxidante hidrófilo y lipófilo. **La hipótesis de este estudio es que uno o ambos, 100 mg y 200 mg de suplementos de lactoferrina bovina mejorarán el estado inmunológico y antioxidante en los seres humanos.**

## METODOS Y MATERIALES.

### Participantes

Se reclutaron ocho voluntarios varones sanos, con una edad media de 40 años (rango, 31-52 años) de la Universidad de Southern Cross (SCU, Lismore, NSW, Australia). Los participantes eran no fumadores sanos y dejaron de tomar todos los medicamentos, incluidos los suplementos de vitaminas, minerales y hierbas durante 14 días antes y durante el período de estudio. El estudio excluyó a los participantes con trastornos inmunes o autoinmunes, diabetes o aquellos que tomaban algún medicamento. A continuación, los posibles participantes se sometieron a una evaluación clínica de la salud que incluyó la recopilación de antecedentes médicos, mediciones de la presión arterial, la frecuencia cardíaca y el índice de masa corporal (IMC) y la determinación de los parámetros de seguridad de la sangre; hemograma completo, prueba de función hepática, niveles de creatinina y electrolitos de urea y proteína C reactiva. Todos los procedimientos y procesos fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación en Humanos de la SCU y el Comité de Ética de Investigación Médica de la Universidad de Queensland (Brisbane, QLD, Australia). Los participantes fueron completamente informados y se obtuvo el consentimiento por escrito de cada sujeto.

### Diseño

El diseño del ensayo fue un estudio de dosis-respuesta intraindividual de medidas repetidas. Se incluyó a un grupo de 8 participantes que se sometieron todos simultáneamente a 3 tratamientos sucesivos (placebo, 100 mg de lactoferrina y 200 mg de lactoferrina) durante un período de 21 días. Todos los participantes comenzaron con 1 cápsula diaria de un placebo durante 7 días (días 0-6), seguida de 1 cápsula diaria de 100 mg de lactoferrina durante 7 días (días 7-13), seguida de 1 cápsula diaria de 200 mg de lactoferrina durante 7 días (días 14-20). La medición de los parámetros inmunes y antioxidantes se realizó en cada visita (es decir, los días 0, 7, 9, 14, 16 y 21).

### Dosificación

La dosis de placebo y lactoferrina fue de 1 cápsula al día, autoadministrada con el desayuno cada mañana. Las cápsulas de placebo contenían 200 mg de fosfato cálcico; Las cápsulas de lactoferrina de 100 mg contenían 100 mg de lactoferrina bovina y 100 mg de fosfato cálcico; y las cápsulas de 200 mg de lactoferrina contenían 200 mg de lactoferrina bovina.

## Resultados

Las medidas de resultado primarias incluyeron cambios in vivo en los recuentos de subconjuntos de linfocitos, incluidos linfocitos T totales (CD3 +), linfocitos T auxiliares (CD4 +), linfocitos T citotóxicos (CD8 +), linfocitos NK totales (CD3 -, CD16 + y / o CD56 +) y células B totales (CD19 +); y cambios ex vivo en parámetros inmunes inespecíficos que incluyen citotoxicidad de células NK. Las medidas de resultado secundarias incluyeron cambios ex vivo en parámetros inmunitarios específicos, incluida la activación de células T; cambios in vivo en los niveles de citocina IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que regulan predominantemente una respuesta inmune mediada por células y niveles de IL-4, IL-6 e IL-10 que regulan predominantemente respuestas mediadas por anticuerpos; y cambios in vivo en el estado antioxidante hidrófilo y lipófilo.

### Obtención de muestras de sangre

La extracción de sangre para los parámetros de seguridad de la sangre, hemograma completo, prueba de función hepática, niveles de electrolitos de urea y creatinina, y parámetros de resultado del estudio de sangre y proteína C reactiva se realizó en los días 0, 7, 9, 14, 16 y 21 después de unas 12 horas de ayuno nocturno. Las muestras para los parámetros de seguridad se analizaron de acuerdo con los procedimientos estándar de laboratorio de diagnóstico en el Northern Rivers Pathology Service, Lismore Base Hospital, Lismore, NSW, Australia. Las muestras para los parámetros de resultado del estudio se analizaron en el Centro de Fitoquímica y Farmacología, SCU, Lismore, NSW, Australia.

### Subconjuntos de linfocitos

Se recogieron cinco mililitros de sangre en un tubo con EDTA, se almacenaron a temperatura ambiente (TA) y se analizaron dentro de las 24 horas posteriores a la recogida. El análisis de citometría de flujo se utilizó para controlar la expresión de antígenos CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD19 +, CD16 + y CD56 + en linfocitos de sangre periférica (PBL). La tinción de PBL se realizó mediante el método Lyse / No Wash usando reactivos del kit MultiTest IMK (nº de catálogo 340503, Becton Dickinson, San José, CA). Brevemente, se agregaron 50  $\mu$ L de sangre total (EDTA) a 20  $\mu$ L de ambos anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína anti-CD3 (FITC) / ficoeritrina CD8 (PE) / proteína clorofila de peridina CD45 (PerCP) / alophycocianina CD4 (APC) y anti-CD3FITC / CD (16 + 56) PE / CD45PerCP / CD19APC). Los tubos se agitaron con vórtex y se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad a TA. Se añadieron cuatrocientos cincuenta microlitros de solución de lisis 1x MultiTest a cada tubo, y los tubos se agitaron con vórtex y se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad a TA. El análisis se llevó a cabo en un citómetro de flujo de 4 colores Calibur, clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) y software MultiSet (Becton Dickinson), usando longitudes de onda de excitación de 488 nm y 635 nm.

### Activación de células T

Se recolectaron cuatro mililitros de sangre en un tubo vacutainer de heparina de litio, se almacenaron a temperatura ambiente y se analizaron dentro de las 24 horas posteriores a la recolección. La activación de linfocitos se midió en sangre completa según la expresión de un marcador de activación temprana CD69 + en células T estimuladas con fitohemaglutinina (PHA-M). Esto se logró usando FastImmune T-cell Value Bundle II (catálogo nº 340408, Becton Dickinson) y citometría de flujo para determinar la población de células T activadas. Brevemente, se agregaron 5  $\mu$ L de 10  $\mu$ g / mL de PHA-M *Phaseolus vulgaris* (Sigma L2646, St Louis, MO) a 500  $\mu$ L de sangre total y se incubaron durante 4 horas a 37 ° C (5% de CO<sub>2</sub>). Se realizaron controles no estimulados en paralelo para cada sujeto. Luego, se agregaron alícuotas de 50  $\mu$ L de sangre preincubada a 10  $\mu$ L de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo (anti- $\gamma$ 1FITC /  $\gamma$ 1PE / CD3PerCP, anti-CD4FITC / CD69PE / CD3PerCP y anti-CD8FITC / CD69PE / CD3PerCP) en 3 tubos separados. Los tubos se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a TA en la oscuridad. Se añadieron a cada tubo cuatrocientos cincuenta microlitros de solución de lisis 1x FACS; Los tubos se agitaron con vórtex y se incubaron durante 15 minutos

en la oscuridad a TA. El porcentaje de células T (células T totales, células T CD4 + y células T CD8 +) que expresan CD69 + se analizó luego usando un citómetro de flujo FACS Calibur de 4 colores y el software CellQuest Pro (Becton Dickinson).

#### Citotoxicidad de células asesinas naturales

Se recogieron cuatro mililitros de sangre en un tubo vacutainer de heparina de litio, se almacenaron a TA y se analizaron dentro de las 12 horas posteriores a la recogida. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre completa usando Isopaque-Ficoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Las PBMC (efectores) se incubaron a 37 ° C durante 2 horas con células diana K562 (ATCC [American Type Culture Collection], Manassas, Va) en una proporción de 25: 1 (efector-diana). Las células diana se marcaron previamente con un colorante fluorescente verde, DiO (V-22886, Molecular Probes, Eugene, Ore), para permitir una diferenciación precisa de las células efectoras. Después de la incubación, se añadió un tinte de ADN fluorescente rojo, yoduro de propidio (P-3566; Molecular Probes, Eugene), para marcar las células diana permeabilizadas por la actividad de las células NK. También se ejecutó un control de células diana para monitorizar la muerte espontánea de las células diana. El porcentaje de células diana muertas se determinó mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur de 4 colores y el software CellQuest Pro. El porcentaje de citotoxicidad específica se determinó restando el porcentaje de células muertas en el tubo de control diana del porcentaje de células diana muertas en cada muestra de prueba.

#### Citoquinas

Se recogieron cinco mililitros de sangre en un tubo separador de suero. La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos y luego se centrifugó a 1500 de fuerza centrífuga relativa (FCR) durante 10 minutos. El suero se retiró y se colocó en un tubo de polipropileno sellado de 1,5 mL y se almacenó a -80 ° C. Las muestras se descongelaron y se mezclaron a fondo inmediatamente antes de la prueba. Las citocinas séricas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se midieron usando un kit de matriz de perlas citométricas Th1 / Th2 (catálogo nº 551809; Becton Dickinson). Las concentraciones de citocinas para cada muestra se determinaron usando un citómetro de flujo FACS Calibur de 4 colores y un software. Las sensibilidades para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  fueron 2.6, 2.6, 3.0, 2.8, 2.8 y 7.1 pg / mL, respectivamente. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las sensibilidades del ensayo se definieron como la concentración correspondiente de 2 DE por encima de la fluorescencia media de 20 réplicas del control negativo (0 pg / ml).

#### Mediciones de la capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno

Se recogieron cinco mililitros de sangre en un tubo separador de suero. La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, luego se centrifugó a 1500 rcf durante 10 minutos y el suero se almacenó a -80 ° C. Se utilizó un ensayo, desarrollado y optimizado sobre la base de un método publicado anteriormente [19], para medir la capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno en suero (ORACFL) de la siguiente manera.

#### Extracción de suero antes del ensayo ORAC FL

Se agregaron 100 microlitros de suero, 100  $\mu$ L de agua, 200  $\mu$ L de etanol y 400  $\mu$ L de hexano a un vial de vidrio transparente se mezclaron en un agitador mecánico durante 5 minutos, se dejaron reposar durante 2 minutos y luego se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rcf. La capa de hexano se retiró y se colocó en un vial de vidrio ámbar. Se agregaron otros 400  $\mu$ l de hexano al vial de vidrio transparente original y se repitió el proceso. Los extractos de hexano se combinaron y se secaron bajo flujo de nitrógeno, listos para el análisis de ORAC FL lipófilo.

Al vial de vidrio transparente original se le añadieron 400  $\mu\text{L}$  de 0,5 mol / L de ácido perclórico (PCA) (número de catálogo 24425-2; Sigma) y 200  $\mu\text{L}$  de 75 mmol / l de tampón de fosfato, luego se agitó en vórtex y se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rcf. El sobrenadante se eliminó en un segundo vial de vidrio transparente listo para el análisis ORAC FL hidrófilo.

#### Ensayo ORAC FL hidrófilo

Se agregaron veinte microlitros de estándares Trolox (Fluka, Buchs, Suiza) (12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{mol}$  / L), controles (40  $\mu\text{mol}$  / L de Trolox) y muestras por duplicado a una microplaca de 96 pocillos (Greiner U tocado fondo). También se agregó una fila de 20  $\mu\text{L}$  de 1,48  $\mu\text{mol}$  / L de solución de fluoresceína (número de catálogo 166308; Sigma) para probar el ruido de fondo. Luego se añadieron ciento setenta microlitros de 30 mmol / L de 2,2', dihidrocloruro de azobis (2-amidinopropano) (AAPH) (nº de catálogo 017-11062; Wako, Osaka, Japón); las lecturas se iniciaron inmediatamente. Todas las diluciones se realizaron utilizando una mezcla de agua MilliQ, etanol, PCA y tampón fosfato en una proporción de 1: 2: 4: 2.

#### Ensayo ORAC FL lipofílico

Se agregaron 200 microlitros de acetona al extracto lipofílico, se dejó reposar durante 10 minutos, luego se agregaron 700  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -ciclodextrina metilada al azar al 7% (RMCD) (Wacker-Chemie, Burghausen, Alemania). El procedimiento de microplaca (JRH de fondo plano) es el mismo que para el ensayo hidrófilo. Se utilizaron diluciones de 100  $\mu\text{mol}$  / L de Trolox como estándares y 500  $\mu\text{mol}$  / L de hidroxitolueno butilado (Sigma) fue el control. Todas las diluciones se realizaron utilizando RMCD al 7%.

Todas las muestras se analizaron en 4 diluciones diferentes por duplicado, y todas las placas de ensayo se leyeron en un analizador de placas múltiples Wallac Victor 2 precalentado a 37 ° C (Perkin Elmer, Turku, Finlandia). El área bajo la curva se calculó mediante integración punto a punto utilizando cinética lenta.

#### Análisis estadístico

Los cambios en los marcadores inmunes y antioxidantes a lo largo del tiempo se compararon mediante análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA de 1 vía) (es decir, 6 visitas - día 0, 7, 9, 14, 16 y 21) o pruebas pareadas (es decir, 2 visitas - día 0 vs día 7), utilizando un paquete de software estadístico (SPSS para Windows, versión 14.0, Chicago, Ill) [20]. Se verificó la distribución normal de los resultados mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk antes de realizar un análisis y ajuste adicionales en consecuencia. Los resultados se corrigieron mediante el procedimiento Green-house-Geisser cuando fue apropiado (violación del supuesto de esfericidad). Todos los valores se expresaron como media  $\pm$  SEM. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

## RESULTADOS

### Parámetros inmunes

Un hallazgo importante del presente estudio fue que después de 2 semanas de suplementación con lactoferrina hubo un aumento estadísticamente significativo en la activación total (CD3 +), auxiliar (CD4 +) y citotóxica (CD8 +) de las células T según lo medido por el porcentaje de células T que expresan el marcador de activación temprana CD69 + (Tabla 1). Normalmente, menos del 2% de las células T no estimuladas expresan CD69 +; sin embargo, se ha demostrado que la estimulación de las células T por el mitógeno Phaseolus vulgaris da como resultado un aumento en la expresión de CD69. El porcentaje de expresión de CD69 + después de la estimulación refleja el grado de activación de las células T. Los ANOVA para medidas repetidas de cambios a lo largo del tiempo desde el día 0 hasta el día 21 revelaron aumentos significativos para la activación de células T; La activación total de células T (CD3 +) aumentó en un 29% sobre la línea de base (F (4,28) = 36.1; P b .001),

la activación de células T auxiliares (CD4 +) aumentó en un 22% sobre la línea de base ( $F(4,28) = 23.1$ ;  $P < 0,001$ ), y la activación de células T citotóxicas (CD8 +) aumentó en un 25% con respecto al valor inicial ( $F(4,28) = 22,5$ ;  $P < 0,001$ ). De manera similar, los ANOVA de medidas repetidas del día 0 al día 16, del día 7 al día 21 y del día 7 al día 16 también revelaron aumentos significativos ( $P < 0,001$ ) para la activación total de células T, la activación de células T auxiliares y la T citotóxica. -activación celular. Además, no hubo cambios significativos en todos los marcadores de activación de células T debido al placebo según lo determinado por el análisis de la prueba t pareada entre el día 0 y el día 7 ( $p = .287$ ,  $p = .451$  y  $p = .664$ , respectivamente).

También se evaluaron los cambios en los recuentos de subconjuntos de linfocitos y la citotoxicidad de las células NK, ninguno de los cuales mostró un cambio significativo entre el valor inicial y 1 o 2 semanas de suplementación (Tabla 1).

Los valores para la mayoría de las citocinas medidas, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10, fueron relativamente bajos y los resultados en la mayoría de los casos (63%) cayeron por debajo del nivel mínimo de detección. Por lo tanto, esta incapacidad para detectar cambios se debió a los bajos niveles séricos, como reflejo del estado de salud de los participantes y / o los límites de sensibilidad del ensayo.

**Tabla 1**

*Marcadores inmunes en suero y concentraciones de capacidad antioxidante para todos los participantes en cada visita*

	Day 0	Day 7	Day 9	Day 14	Day 16	Day 21
T-cell activation (% CD69 <sup>+</sup> )						
Total (CD3 <sup>+</sup> )	42.9±4.6	44.4±3.8	40.4±3.8	NA	53.3±5.3**	55.2±4.6**
Helper (CD4 <sup>+</sup> )	43.4±4.9	44.6±3.9	39.7±4.4	NA	52.8±5.3**	52.8±5.1**
Cytotoxic (CD8 <sup>+</sup> )	43.4±5.3	42.6±4.4	40.2±4.3	NA	52.0±5.6**	54.4±5.2**
Lymphocyte subset ( $\times 10^9$ /L)						
Total (CD3 <sup>+</sup> ) T cells	1.53±.13	1.65±.14	1.71±.18	1.47±.19	1.66±.23	1.67±.21
Helper (CD4 <sup>+</sup> ) T cells	.99±.08	1.03±.09	1.11±.12	.91±.12	1.07±.15	1.07±.12
Cytotoxic (CD8 <sup>+</sup> ) T cells	.48±.07	.54±.08	.54±.08	.48±.08	.53±.09	.54±.09
Total B cells	.24±.04	.25±.03	.26±.05	.23±.04	.25±.05	.26±.05
Total NK cells	.26±.05	.27±.05	.28±.06	.27±.05	.24±.05	.27±.05
NK cell cytotoxicity (% K562 cells killed)	30.8±4.9	28.7±5.1	28.0±4.9	25.9±4.4	23.6±4.0	24.0±5.0
Antioxidant capacity ( $\mu\text{mol/L}$ Trolox equivalents/L)						
Total	2536±208	2709±174	2796±254	2654±249	2813±274	2745±268
Hydrophilic	979±69	1050±94	1050±85	1081±81	1208±113*	1154±65*
Lipophilic	1556±173	1658±164	1745±225	1573±185	1604±193	1591±217

*Todos los participantes se autoadministraron durante 21 días, 1 cápsula de placebo (carbonato de calcio) durante 7 días, seguido de 100 mg de cápsula de lactoferrina durante 7 días, seguido de 200 mg de cápsula de lactoferrina durante 7 días. Se recogieron muestras de sangre después de ayunar durante la noche los días 0, 7, 9, 14, 16 y 21 del estudio. Todos los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 8).*

#### Capacidad antioxidante

El otro hallazgo importante fue un aumento estadísticamente significativo en la capacidad antioxidante hidrófila (CA) después de 2 semanas de suplementación con lactoferrina (Tabla 1). Las mediciones repetidas de ANOVA a lo largo del tiempo desde el inicio (día 0) hasta la finalización de la suplementación con lactoferrina (día 21) revelaron que la CA hidrófila aumentó de  $979 \pm 69 \mu\text{mol} / \text{L}$  de equivalentes de trolox (TE) / L a  $1154 \pm 65 \mu\text{mol} / \text{L}$  TE / L ( $F(2,3,16,3) = 3,2$ ;  $P = 0,05$ ). El análisis de la prueba t pareada entre el día 0 y el día 7 no reveló cambios significativos debido al placebo ( $t(7) = -1,107$ ;  $P = .305$ ); sin embargo, el ANOVA de

medidas repetidas desde el día 7 (inicio de 100 mg de lactoferrina) hasta el día 21 no reveló aumentos significativos ( $F(4,28) = 2,0$ ;  $P = 0,127$ ). Además, no hubo aumentos significativos entre el inicio y el día 14 después de 1 semana de 100 mg de lactoferrina ( $F(3,21) = 1,4$ ;  $P = .280$ ). También se evaluaron los cambios en la CA lipofílica y total; sin embargo, los resultados no mostraron cambios significativos en los niveles séricos entre el valor inicial y 1 o 2 semanas de suplementación (Tabla 1).

## Seguridad

En general, los participantes toleraron bien los suplementos de placebo y lactoferrina. Se informó una pequeña cantidad de eventos adversos que incluyen dolor de cabeza, dolor de muelas y fiebre del heno; todos fueron transitorios, menores y no relacionados con la medicación del estudio. La presión arterial, la frecuencia cardíaca, el peso corporal y los parámetros de seguridad sanguínea, el recuento sanguíneo completo, las pruebas de función hepática, la proteína C reactiva y los niveles de electrolitos de urea y creatinina se evaluaron en cada visita (es decir, los días 0, 7, 9, 14, 16 y 21). Los resultados permanecieron estables y no se informaron cambios adversos para ningún participante.

## DISCUSIÓN

En este estudio, un suplemento de lactoferrina bovina administrado durante 2 semanas a hombres sanos moduló la función inmunológica y el estado antioxidante de estos participantes. Este cambio se reflejó en un aumento significativo en la activación total de células T (CD3+) ( $P < .001$ ), la activación de células T auxiliares (CD4+) ( $P < .001$ ) y las células T citotóxicas (CD8+). activación ( $P < 0,001$ ) que ocurrió entre los días 0 y 16, los días 0 y 21, los días 7 y 16 y los días 7 y 21. Sin embargo, no se demostró un aumento significativo después de solo 1 semana de una lactoferrina diaria de 100 mg suplemento (día 14) debido a datos insuficientes. Además, hubo un aumento significativo en los niveles de antioxidantes hidrófilos entre los días 0 y 16 y los días 0 y 21 ( $P < 0,05$ ), pero no entre los días 0 y 14, los días 7 y 14, los días 7 y 16 o los días 7 y 21 ( $P =$  no significativo) (Fig. 1). Por lo tanto, este aumento en la activación de las células T y la CA hidrófila se observó solo después de 1 semana de 100 mg de suplementación seguida de 1 semana de 200 mg de suplementación.

La activación de las células T auxiliares CD4+ estimula la producción de células B plasmáticas, células B de memoria y anticuerpos, lo que aumenta la vigilancia y el marcado de bacterias y hongos. Estudios previos in vivo en ratones que utilizan lactoferrina bovina han demostrado su eficacia frente al desafío con *Escherichia coli* [9,21], *Helicobacter pylori* [10], *Helicobacter felis* [22], *Candida albicans* [11] y *Trichophyton rubrum* [17], que puede explicarse mediante el mecanismo anterior.

Además, la activación de las células T CD4+ potencia la función de los macrófagos, estimulando la liberación de citocinas, tanto antiinflamatorias (IL-4, IL-10) como proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Por tanto, parecería que la lactoferrina puede mejorar la actividad antiinflamatoria y / o disminuir los mecanismos proinflamatorios. Esto se ha demostrado en estudios con roedores, que mostraron una disminución de la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  después de timentomía y esplenectomía después de que ocurriera la suplementación con lactoferrina [23]. Se ha informado un aumento de la producción de IL-4 e IL-10 y una reducción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en ratas suplementadas con lactoferrina, después de la colitis intestinal inducida [12]. Además, un pequeño ensayo clínico en personas sanas mostró que, después de la suplementación con 10 mg o 50 mg de lactoferrina por día, la capacidad de las células de la sangre periférica para producir espontáneamente IL-6 proinflamatoria y TNF- $\alpha$  también se redujo significativamente. [15]. Nuestros resultados, sin embargo, se basan en un método que evalúa los niveles de citocinas en suero y no demostró cambios en los niveles de citocinas a lo largo del tiempo; probablemente debido a los niveles iniciales bajos en participantes sanos que oscilaron por debajo del nivel de sensibilidad. La producción de citocinas podría haberse medido ex vivo a partir de células mononucleares de sangre periférica estimuladas, pero esto no se realizó en este estudio.

La activación de los linfocitos T auxiliares (CD4 +) también estimula la producción de linfocitos T citotóxicos (CD8 +) que atacan y destruyen las células invadidas por virus, las células cancerosas, las bacterias intracelulares, los parásitos intracelulares y las células extrañas, como lo demuestran los estudios in vitro sobre el herpes simple. [24], rotavirus [25], virus de la hepatitis C [18] y cánceres inducidos experimentalmente [6,26]. De acuerdo con los resultados de un pequeño ensayo clínico realizado por Ishikado et al [27], nuestros resultados tampoco respaldan ningún cambio en el número de recuentos de subconjuntos de linfocitos, incluidas las células T, las células B y las células NK.

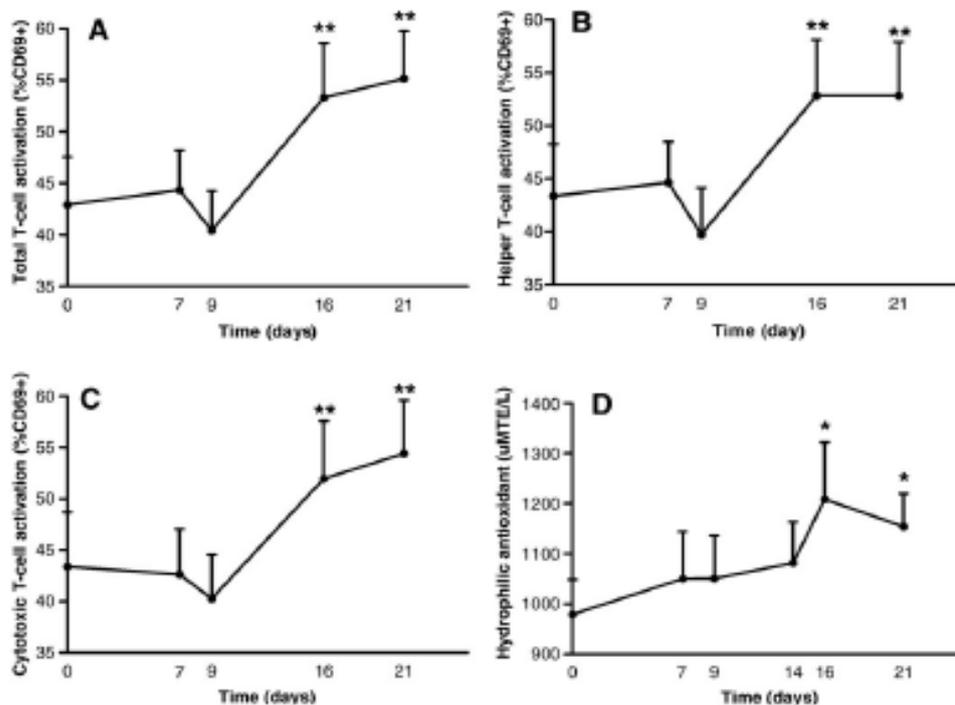


Figura. 1. Respuestas de activación total de células T (CD3 +) (A), activación de células T auxiliares (CD4 +) (B), activación de células T citotóxicas (CD8 +) (C) y capacidad antioxidante hidrófila (D) a Suplementos de lactoferrina para todos los participantes (n = 8). Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas. \*\* indica una diferencia significativa entre el día 0 y el día 7 ( $p < 0,001$ ). \* indica una diferencia significativa desde el día 0 ( $P < 0,05$ ) pero no el día 7 ( $P \geq 0,05$ ).

Generalmente se piensa que la lactoferrina endógena exhibe propiedades antioxidantes hidrófilas debido a su capacidad de secuestrar hierro. Sin embargo, se desconoce si la suplementación oral de lactoferrina se traducirá en una mayor capacidad antioxidante sistémica. Nuestros resultados demuestran un aumento significativo en la capacidad antioxidante hidrófila sérica ( $P < 0,05$ ). Si las propiedades antioxidantes de la lactoferrina existen en virtud de su capacidad de secuestrar hierro, funciona a través de un mecanismo preventivo como la disminución de la formación de radicales hidroxilos a través de la reacción de Fenton. Sin embargo, el ensayo ORACFL se considera específico para los antioxidantes que utilizan el mecanismo de ruptura de la cadena [28]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la capacidad antioxidante determinada en el suero después de la intervención con lactoferrina puede no deberse totalmente a su capacidad de secuestrar hierro. Una explicación, dado que se cree que la lactoferrina per se no se absorbe a través de la pared intestinal [29], es que los fragmentos digeridos de lactoferrina, como la lactoferricina, se unen a las células epiteliales gastrointestinales que modulan la producción de antioxidantes. Por lo tanto, posiblemente solo en el tracto gastrointestinal la lactoferrina actúe como un antioxidante secuestrador de hierro.

Los resultados de este estudio refuerzan el perfil de seguridad asociado con la lactoferrina bovina como seguro para la administración oral en dosis de hasta 200 mg / día, es decir, no se observaron cambios significativos en las mediciones de seguridad fisiológicas o de los parámetros sanguíneos en este estudio, aplicado a Linfocitos CD4 + Th1 (que promueven la inmunidad mediada por células clásica), linfocitos CD4 + Th2 (involucrados en reacciones de tipo alérgico) o todos los linfocitos T auxiliares (CD4 +).

Este informe demuestra que la suplementación oral de lactoferrina bovina, en particular 100 mg durante 7 días seguidos de 200 mg durante 7 días, mejora la activación total, auxiliar y citotóxica de las células T y el estado antioxidante hidrófilo. Este hallazgo sugiere que los suplementos de lactoferrina bovina tienen el potencial de ser un complemento nutricional útil que respalda la estimulación inmunológica y el estado de la capacidad antioxidante en individuos por lo demás sanos.

REFERENCIAS: Ver estudio en ingles