



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA  
MOLECULAR**

**EFFECTOS INMUNOMODULADORES POR PARTE DE  
LACTOFERRINA BOVINA Y SUS PEPTIDOS DERIVADOS EN LÍNEAS  
CELULARES DE LEUCEMIA, JURKAT Y RAW 264.7**

**TESIS**

**Que presenta:**

**DANIELA ALEJANDRA BASTIDAS**

**Para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Directores:**

**DRA. NIDIA MARIBEL LEÓN SICAIROS  
DR. VICENTE ADRIAN CANIZALEZ ROMÁN**

**Comité Tutorial:**

**Dr. URIEL ALBERTO ÁNGULO ZAMUDIO  
DR. JORGE ADALBERTO VELAZQUEZ ROMÁN  
DR. JOEL RUEDAS CÁRDENAS**

Culiacán, Sinaloa, México

Junio, 2024



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



El presente trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Biología Celular y Molecular, de la Facultad de Medicina, perteneciente a la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección a Dra. Nidia Maribel León Sicarios (Profesora e Investigadora, SNII-III del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la UAS), y del Dr. Vicente Adrián Canizalez Román (Profesor e Investigador SNII-III del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UAS). Para el desarrollo del proyecto se contó con financiamiento de PROFAPI-UAS (PRO-2022-A3-037). Para cursar la maestría, la estudiante Daniela Alejandra Bastidas recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), con CVU 1152341, con fecha en septiembre de 2021 a agosto de 2023, para la obtención de grado de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular. También se recibió apoyo para asistir como speaker al XV International Conference on Lactoferrin, Structure, Functions and Applications, en Roma Italia, por parte del CONFÍE.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda incondicional de mis padres, que me han brindado el apoyo incansable para lograr todos los sueños que me he propuesto, y cumplir todos mis objetivos personales y profesionales, que con su cariño me han impulsado siempre. A mis tutores, la Dra. Nidia Maribel León Sicairos y el Dr. Vicente Adrián Canizalez Román, a los cuales les agradezco profundamente su dedicación y paciencia, así como sus palabras y guía, acompañando cada uno de mis aprendizajes en el camino sin los cuales no habría podido llegar a este momento tan anhelado. Llevaré conmigo en todo momento sus enseñanzas.

Quiero agradecer también a mis docentes, a todos aquellos que fueron parte de mi formación académica, por pequeña o grande que haya sido la lección, fueron parte de esto en conjunto y eso me acompañará una vida.

Agradecer enormemente los amigos que me dio este peldaño de mi vida, puesto que como escuché alguna vez: “donde sea que estés, los amigos son los que le dan forma a tu mundo”. Miriam Benítez, Jarianth Aispuro, Enrique Angulo, Lorena Félix, Shaamira Vega, Carolina Lira, y María Velázquez, por brindarme siempre su apoyo, las risas compartidas, y hacer que este trayecto fuese más bello.

Por último y no menos importante a CONACyT y CONFIE, que sin el apoyo económico brindado no habría podido culminar satisfactoriamente mi posgrado y a mi alma mater, la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa por brindarme el espacio, las instalaciones y la oportunidad de crecer profesionalmente.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	- 1 -
ABSTRACT	- 2 -
I. MARCO TEÓRICO	- 3 -
A. Introducción	- 3 -
B. Cáncer	- 13 -
1. Definición	- 13 -
2. Epidemiología	- 14 -
3. Fisiopatología	- 16 -
4. Clasificación	- 17 -
5. Factores de riesgo	- 18 -
C. Leucemia	- 19 -
1. Definición y clasificación de las leucemias	- 21 -
2. Fisiopatología de las leucemias	- 22 -
3. Factores de riesgo para las leucemias	- 22 -
4. Datos y cifras del cáncer infantil	- 26 -
5. Tratamiento de las leucemias	- 27 -
D. Lactoferrina (LF)	- 31 -
1. Definición y generalidades	- 31 -
2. Origen y estructura	- 32 -
3. Lactoferrina y su papel en la respuesta inmune	- 34 -
4. Lactoferrina en leucemia	- 36 -
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 39 -

III.	JUSTIFICACIÓN	- 40 -
IV.	HIPÓTESIS	- 41 -
V.	OBJETIVOS	- 42 -
	A. Objetivo general	- 42 -
	B. Objetivos particulares	- 42 -
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	- 43 -
	A. Lactoferrina bovina y péptidos derivados	- 43 -
	B. Reactivos	- 43 -
	C. Establecimiento y tratamiento de las líneas celulares Jurkat y Raw	- 43 -
	D. Ensayo de endocitosis	- 44 -
	E. Ensayo de actividad fagocítica de Monocitos (Células RAW).	- 45 -
	F. Determinación de la concentración de las citocinas	- 46 -
	G. Análisis estadístico	- 46 -
VII.	RESULTADOS	- 47 -
	A. Lactoferrina bovina y los péptidos interaccionan con componentes de membrana de la línea celular de macrófagos RAW 264.7	- 47 -
	B. Lactoferrina bovina y los péptidos interaccionan con componentes de membrana de células Jurkat	- 50 -
	C. Lactoferrina bovina activa la fagocitosis de <i>Escherichia coli</i> HB101 acoplada a TRITC en las células RAW 264.7	- 53 -
	D. Lactoferrina modula la liberación de citocinas en células Jurkat	- 55 -
VIII.	DISCUSIÓN	- 63 -
IX.	CONCLUSIONES	- 70 -
X.	BIBLIOGRAFÍA	- 71 -
XI.	ANEXOS	- 83 -

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de Lactoferrina humana recombinante diférrica.	- 33 -
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los efectos de la lactoferrina en el organismo.	- 37 -
<b>Figura 3.</b> Lactoferricina 17-30-FITC, Lactoferrampina 265-284-FITC y Lactoferrina quimera-FITC interaccionan con células RAW 264.7	- 48 -
<b>Figura 4.</b> Lactoferrina bovina interacciona con células RAW 264.7.	- 49 -
<b>Figura 5.</b> Lactoferricina 17-30-FITC, Lactoferrampina 265-284-FITC y Lactoferrina quimera-FITC interaccionan con células Jurkat	- 51 -
<b>Figura 6.</b> Lactoferrina interacciona con células Jurkat	- 52 -
<b>Figura 7.</b> Lactoferrina bovina activa la fagocitosis de <i>Escherichia coli</i> HB101-TRITC en macrófagos RAW 264.7	- 54 -
<b>Figura 8.</b> Lactoferrina promueve la secreción de Factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) en células Jurkat incubadas con <i>Escherichia coli</i> HB101.	- 57 -
<b>Figura 9.</b> Liberación de IL-6 en células Jurkat pretratadas con Lactoferrina bovina en presencia de <i>Escherichia coli</i> HB101	- 58 -
<b>Figura 10.</b> Producción de IL-12 en células Jurkat pretratadas con Lactoferrina bovina ante la presencia de <i>Escherichia coli</i> HB101.	- 59 -
<b>Figura 11.</b> Concentración de IL-4 en presencia de <i>Escherichia coli</i> HB101 y lactoferrina bovina..	- 61 -
<b>Figura 12.</b> Resumen de los datos más representativos sobre la inmunomodulación de citocinas en células pretratadas de LF.	- 62 -

## RESUMEN

**Título:** “Efectos inmunomoduladores por parte de Lactoferrina bovina y sus péptidos derivados en líneas celulares de leucemia, Jurkat y RAW 264.7”. **Introducción:** Cada año se presenta cáncer en aproximadamente 400,000 niños y adolescentes de entre 0 y 19 años. Las neoplasias más frecuentes en este grupo de edad son, las leucemias, cánceres cerebrales, linfomas y tumores sólidos, así como también el neuroblastoma y los tumores de Wilms. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incidencia de cáncer en menores de 15 años se ha incrementado en más del 200% en los países en desarrollo. Entre los tratamientos empleados para el cáncer infantil se encuentran: cirugía, quimioterapia, radioterapia y, en casos especiales, el trasplante de médula ósea. Uno de los últimos desarrollos es la inmunoterapia, que se está convirtiendo en un pilar para el tratamiento de estas neoplasias malignas puesto que tratamientos como la quimioterapia tiene una variedad de efectos secundarios, como infección, daño de órganos, hematológicos y otros (desnutrición, pérdida de cabello). Además, la mayoría de los agentes causan inmunosupresión y mielosupresión, aumentando el riesgo para los niños de adquirir infecciones bacterianas, virales y fúngicas. La infección sigue siendo una de las principales causas de muerte. La proteína Lactoferrina (LF), clave en la respuesta inmune innata, es uno de los blancos de mayor estudio como posible antitumoral, microbicida, antioxidante, inmunoregulador, e inmunoestimulador. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue determinar la interacción de la proteína lactoferrina bovina (bLF) y sus péptidos derivados con las líneas celulares Jurkat y RAW 264.7, así como los posibles efectos inmunomoduladores de bLF en estas células. **Métodos:** Se realizó en primera instancia un ensayo de fluorescencia directa para evaluar la interacción de péptidos derivados de bLF con las membranas celulares de células Jurkat y RAW 264.7. Posteriormente por medio de inmunofluorescencia indirecta se detectó la unión de bLF a las líneas celulares Jurkat y RAW 264.7. Por último, se realizó un ensayo de fagocitosis para evaluar la capacidad de bLF para estimular la actividad fagocítica de macrófagos RAW 264.7 contra *Escherichia coli* HB101 (*E. coli* HB10). A su vez, a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se cuantificó la

producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) y antiinflamatorias (IL-4) por células Jurkat en presencia de bLF y *E. coli* HB101. **Resultados:** Los resultados del estudio demostraron lo siguiente que tanto bLF como sus péptidos derivados (lactoferricina, lactoferrampina y quimera de lactoferrina) interactuaron con las membranas celulares de las células Jurkat y RAW 264.7, como lo demuestran los experimentos de microscopía de fluorescencia. bLF mejoró la actividad fagocítica de los macrófagos RAW 264.7 contra *E. coli* HB10, con un aumento notable en la intensidad de la fluorescencia (lo que indica una mayor absorción bacteriana) en las células tratadas con bLF en comparación con los controles no tratados. En las células Jurkat, bLF moduló la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) y antiinflamatorias (IL-4) en presencia de *E. coli* HB10. El pretratamiento con bLF redujo la producción de citocinas proinflamatorias y aumentó la producción de la citocina antiinflamatoria IL-4.

## SUMMARY

**Title:** “Immunomodulatory effects by bovine lactoferrin and derived peptides in leukemic cells lines Jurkat and RAW 264.7”. **Introduction:** Every year, cancer occurs in approximately 400,000 children and adolescents between 0 and 19 years of age. The most common neoplasms in this age group are leukemias, brain cancers, lymphomas and solid tumors, as well as neuroblastoma and Wilms tumors. According to the World Health Organization (WHO), the incidence of cancer in children under 15 years of age has increased by more than 200% in developing countries. Among the treatments used for childhood cancer are surgery, chemotherapy, radiotherapy and, in special cases, bone marrow transplant. One of the latest developments is immunotherapy, which is becoming a mainstay for the treatment of these malignancies since treatments such as chemotherapy have a variety of side effects, such as infection, organ damage, hematological and others (malnutrition, loss of hair). Additionally, most agents cause immunosuppression and myelosuppression, increasing children's risk of acquiring bacterial, viral, and fungal infections. Infection remains one of the leading causes of death. The protein Lactoferrin (LF), key in the innate immune response, is one of the targets of greatest study as a possible antitumor, microbicide, antioxidant, immunoregulator, and immunostimulator. **Main:** The objective of this work was to determine the interaction of the bovine lactoferrin (bLF) protein and its derived peptides with the Jurkat and RAW 264.7 cell lines, as well as the possible immunomodulatory effects of bLF on these cells. **Methods:** A direct fluorescence assay was first performed to evaluate the interaction of peptides derived from bLF with the cell membranes of Jurkat and RAW 264.7 cells. Subsequently, by means of indirect immunofluorescence, the binding of bLF to the Jurkat and RAW 264.7 cell lines was detected. Finally, a phagocytosis assay was performed to evaluate the capacity of bLF to stimulate the phagocytic activity of RAW 264.7 macrophages against *Escherichia coli* HB101 (*E. coli* HB10). In turn, through an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the production of proinflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines by Jurkat cells in the presence of bLF and *E. coli* HB10. **Results:** The

results of the study demonstrated that both bLF and its derived peptides (lactoferricin, lactoferranphin and lactoferrin chimera) interacted with the cell membranes of Jurkat and RAW 264.7 cells, as demonstrated by fluorescence microscopy experiments. bLF enhanced the phagocytic activity of RAW 264.7 macrophages against *E. coli* HB10, with a notable increase in fluorescence intensity (indicating increased bacterial uptake) in bLF-treated cells compared to untreated controls. In Jurkat cells, bLF modulated the production of pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines in the presence of *E. coli* HB101. Pretreatment with bLF reduced the production of proinflammatory cytokines and increased the production of the anti-inflammatory cytokine IL-4.

## I. MARCO TEÓRICO

### A. Introducción

En la praxis clínica, “*cáncer*” es un término utilizado para referirse a más de un centenar de enfermedades distintas, con origen, epidemiología, factores de riesgo, tipos de diseminación, respuesta al tratamiento y pronóstico diversos y variados. Para el médico, esto siempre ha implicado un reto cuando se trata de devolver la salud al paciente (Kumar & Abbas, 2021).

Visto desde otro punto de vista, el cáncer es un problema de salud pública, ya que causa una enorme pérdida de vidas humanas y recursos económicos. De hecho, las muertes por cáncer y sus complicaciones, ocupan el primer lugar a nivel mundial. Estas enfermedades son de las principales causas de mortalidad en la adultez, pero también en la niñez y la adolescencia. El abandono de las pautas terapéuticas, la falta de acceso a tratamientos, la muerte por toxicidad (efectos secundarios de la medicación) y recidivas evitables, son de los principales factores que afecta a la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer en países como el nuestro, comparado con un 80% en los países de ingresos económicos altos.

Los cánceres infantiles son menos estudiados en comparación con los cánceres de adultos. Por ello, la mejora del acceso a la atención oncológica infantil, en particular a tecnologías y fármacos esenciales, resulta muy beneficioso para la población infantil. La tasa de supervivencia global en niños con leucemia de los últimos años se ha encontrado de un 80-90%, mostrando una mejora notable. Esto se debe a los regímenes de terapia multifarmacológica contemporáneos. No obstante, los pacientes se ven abrumados por complicaciones graves del tratamiento (Ma et al., 2019; Weinberg & Cook, 2002).

Dentro del enfoque de la biología celular, el cáncer se desencadena con un solo cambio genético en una sola célula, que comienza a proliferar hasta dar lugar a una masa (tumor) que, en ausencia de tratamiento, se disemina a otras partes del

organismo y causa daños que progresan hasta provocar la muerte. La tumorigénesis es un proceso que se presenta en varias etapas involucrando cambios genéticos secuenciales o epigenéticos, por ejemplo; las células que reingresan al ciclo celular deben ser independientes del factor de crecimiento, escapar a la apoptosis, mantener sus telómeros, reorganizar la vasculatura circundante y adquirir propiedades invasivas para convertirse en un cáncer metastásico (Kumar & Abbas, 2021).

El desarrollo de tumores malignos en la población es considerado un problema de salud pública ya que el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. Casi 10 millones de personas murieron por esta enfermedad solo en 2020, casi una de cada seis. En 2020, se registró que los tipos de cáncer más comunes son los de mama, pulmón, colon y recto, y próstata. El consumo de tabaco, el alto índice de masa corporal, el consumo de alcohol, la ingesta inadecuada de frutas y verduras y la falta de actividad física representan aproximadamente un tercio de las muertes por cáncer. Además, las infecciones oncogénicas, entre ellas las causadas por los virus de las hepatitis o el papiloma humano, ocasionan aproximadamente el 30% de los casos de cáncer en los países de bajos y medianos ingresos (World Health, 2021).

A diferencia de lo que ocurre con el cáncer en los adultos, se desconocen las causas de la inmensa mayoría de los casos de cáncer infantil. Se han realizado numerosos estudios para tratar de esclarecer las causas, pero a esa edad hay muy pocos cánceres debido a factores ambientales o ligados al modo de vida.

Con respecto al cáncer infantil en México, considerando que, de acuerdo con la Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica de 2018, en el país residen 38.5 millones de niñas, niños y adolescentes de 0 a 17 años, que representan el 30.8 % del total de población, de acuerdo con los datos del Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes (RCNA) las tasas de Incidencia (por millón) hasta el 2017 fueron: 89.6 Nacional, 111.4 en niños (0 a 9 años) y 68.1 en Adolescentes (10-19 años). Respecto a las tasas de mortalidad (por 100,000 habitantes) los adolescentes entre los 15 y los 19 años de edad tuvieron la mayor tasa de mortalidad con 6.88, mientras que la menor tasa de mortalidad fue para el grupo de edad entre los 0 y los 4 años con 4.35. Entre los 5 y los 14 años las tasas se mantuvieron similares entre ambos grupos con 4.60 (5

a 9 años) y 4.54 (10 a 14 años). Lo cual nos sitúa en un rango superior al alcanzado por ciertas poblaciones de Centro y Sudamérica, además de Canadá y Estados Unidos (de Martel, Georges, Bray, Ferlay, & Clifford, 2020; INEGI, 2021; OMS, 2019).

En México, durante 2017 de cada 100 egresos hospitalarios por cáncer (tumores malignos), en la población de 0 a 19 años, 73 fueron en tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados. Como parte de esta clasificación, se encuentra la leucemia linfocítica que por sí sola, representa 61% (24,851) del total de egresos por cáncer (40,679) en este grupo de la población, siendo la más frecuente de las neoplasias en niños (sistema nervioso y hueso o cartílago son la segunda y tercera neoplasia más común, en niños). De acuerdo con informes realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de cáncer en menores de 15 años se ha incrementado en más del 200% en los países en desarrollo (de Martel et al., 2020; WHO, 2021). En nuestro Estado de Sinaloa, en el Hospital Pediátrico las leucemias, tumores del cerebro y los linfomas son los cánceres más comunes de la niñez. Cada año se presentan aproximadamente 160 casos de cáncer infantiles en el Estado. Tan solo en el Hospital Pediátrico de Sinaloa se reciben 55 nuevos casos de niños con cáncer cada año, siendo la leucemia linfocítica aguda el cáncer más frecuente en la población atendida, seguida de tumores cerebrales y linfomas (de ellos el 30% morirá, el restante entrará en remisión 5 años después de haber sido diagnosticado y es probable que presenten efectos secundarios a largo plazo) (CENSIA, 2023). Estos datos son similares a los reportados a nivel nacional, donde se reporta que el 70% de los niños que padecen cáncer pueden entrar en remisión una vez que son tratados adecuadamente e inclusive llegar a la edad adulta. Sin embargo; el tratamiento puede llegar a ser arduo y complejo, costoso y con seguimientos largos hacia el paciente que no siempre terminan victoriosos, lo cual puede llegar a ser desmoralizante.

Dado que en general no es posible prevenir el cáncer en los niños, la estrategia más eficaz para reducir la carga de morbilidad y mejorar la evolución clínica es centrarse en un diagnóstico precoz y correcto, seguido de un tratamiento eficaz, certero y oportuno; y científicamente contrastado que se acompañe de medidas de apoyo

personalizado. Los tratamientos empleados para el cáncer infantil al igual que de los cánceres en adultos, depende del tipo de cáncer, estadio y localización y consisten en: cirugía, quimioterapia, radioterapia y, en casos especiales, el trasplante de médula ósea (Yeoh et al., 2017). En los últimos años, ha habido una mejora en la supervivencia global de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil, que ahora está en torno al 80-90%. Esto se debe a los regímenes de terapia multifarmacológica contemporáneos, no obstante; los pacientes se ven abrumados por complicaciones graves del tratamiento (Suchato, 2015). La quimioterapia tiene una variedad de efectos secundarios, como infección, daño de órganos, hematológicos y otros (desnutrición, pérdida de cabello). La mayoría de los agentes que causan inmunosupresión y mielosupresión aumentan el riesgo de infecciones bacterianas, virales y fúngicas. La infección sigue siendo una de las principales causas de muerte en todos los niños. Todos los órganos pueden verse afectados adversamente por el tratamiento antileucémico, siendo la complicación más común la toxicidad gastrointestinal, neuropatía central y/o periférica, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, disfunción cardíaca, y toxicidad esquelética. Por otro lado, en algunos casos se puede ver afectada la fertilidad (Zawitkowska et al., 2019).

La toxicidad de los agentes antitumorales puede dar lugar a desviaciones en la quimioterapia, como retrasos en el tratamiento, reducciones de dosis u omisiones. Los datos de la literatura revelan que las interrupciones de la terapia inducidas por toxicidad también podrían comprometer el resultado del tratamiento. Por lo tanto, es importante reducir la toxicidad de los tratamientos administrados en los niños con ALL (Alsuwaigh, Lee, Chan, Chee, & Choo, 2019; Schmiegelow et al., 2017; Zawitkowska et al., 2019), un análisis y discusión de los efectos secundarios de la terapia son necesarios para establecer estrategias para minimizarlos o anularlos. Incluso en ocasiones suele presentarse un cáncer secundario debido a las radiaciones recibidas, además de esterilidad, alteraciones óseas, retraso mental, deficiencia de hormonas, etc. (Zawitkowska et al., 2019).

En resumen, los tratamientos disponibles actualmente para diferentes tipos de leucemia, incluida la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfocítica aguda, mejoran la

tasa de supervivencia en niños diagnosticados, no obstante; las consecuencias a largo plazo pueden manifestarse como enfermedades cardiovasculares que aumentan el riesgo de muerte (uno de los múltiples daños ocasionados) (Eryilmaz & Canpolat, 2017; Gibson, Ehrhardt, & Ness, 2016).

Se han realizado numerosos estudios para conocer las causas de cáncer infantil, pero a esa edad (0-19), no se puede relacionar los tipos de cánceres con factores ambientales o ligados al modo de vida debido a que corta edad significa poca exposición. Por lo tanto, las medidas de prevención del cáncer en los niños deben centrarse en los comportamientos que impedirán que más adelante, cuando sean adultos, sufran cánceres prevenibles, en el diagnóstico oportuno y en tratamientos menos tóxicos que eviten la muerte por combinación de métodos y recidiva (World Health, 2021).

Es por esto que está plenamente justificada la investigación y la búsqueda de un diagnóstico más certero, una mejor terapia, intervención, protocolos de tratamientos, etc., a fin de evitar las complicaciones anteriormente descritas por la atención a los niños con cáncer. Aunque se ha realizado un notable avance en la obtención de nuevos agentes empleados en la quimioterapia, la mayoría de ellos son drogas muy tóxicas, que deterioran físicamente a los pacientes con cáncer y también destruyen las células normales (Alsuwaigh et al., 2019). En el caso del cáncer infantil se usan frecuentemente combinaciones de cisplatino, vincristina, prednisona, etóposido etc., agentes que dañan el ADN de las células o bien, dirigen las células a apoptosis. Un hecho alarmante, aparte de la elevada toxicidad de estos fármacos es que las células tumorales se vuelven rápidamente resistentes a ellos, o tolerantes, y es necesario emplear dosis muy altas y más de tres agentes quimioterapéuticos en un esquema de tratamiento muy tóxico sobre todo en leucemias de mal pronóstico. En consecuencia, la mortalidad se da porque se emplean en un solo niño diversas combinaciones y las células tumorales se van volviendo resistentes, hasta que no existe opción de tratamiento para ellos (Suchato, 2015).

Todo esto ha llevado a la búsqueda de nuevos fármacos naturales o sintéticos seguros, no tóxicos y que no generen efectos a corto y largo plazo, que ayuden a la

recidiva, y a mejorar la calidad de vida en los pacientes con cáncer, aún mejor, a tolerar de mejor manera los ciclos quimioterapéuticos y de radiación sin las complicaciones o efectos secundarios que estos conllevan. Las investigaciones se han dirigido en torno a compuestos de origen natural presentes en la respuesta inmune innata, que aparte de ser antitumorales, tienen otro tipo de efectos que en gran manera ayudarían a disminuir los efectos primarios del tratamiento del cáncer, que regularían la respuesta inmune y que podrían tener propiedades microbicidas y actuar junto con antibióticos y quimioterapéuticos en pacientes con cáncer.

Durante la última década, el tratamiento contra el cáncer ha experimentado cambios alentadores. Uno de los últimos desarrollos es la inmunoterapia, que se está convirtiendo cada vez más en un pilar para el tratamiento de estas neoplasias malignas (Alsuwaigh et al., 2019; Boffo, Damato, Alfano, & Giordano, 2018; Suárez Casillas, 2020). A diferencia de la quimioterapia convencional, la inmunoterapia potencia la respuesta inmunitaria antitumoral al bloquear los inhibidores de puntos de control inmunitarios y permitir que nuestro propio sistema inmunitario luche contra las células tumorales, surgiendo como un mecanismo de acción nuevo e innovador (Suárez Casillas, 2020). Por lo tanto, aunque se toleran bien, estos medicamentos tienen un perfil de efectos secundarios único y se sabe que causan eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario. Los efectos adversos de la inmunoterapia se observan con mayor frecuencia en la piel, el tracto gastrointestinal, el hígado, los pulmones y los sistemas endocrinos (Martín, Escudero, Girón, & Gómez, 2021). Las toxicidades menos comunes pueden incluir afectación neurológica, hematológica, cardíaca, ocular o reumatológica (Boffo et al., 2018). Hasta donde sabemos, los pacientes con cáncer son atendidos con frecuencia el servicio de urgencias debido a la toxicidad relacionadas con el tratamiento, a infecciones adquiridas por tener el sistema inmune deprimido y a las recidivas, por lo que existe una necesidad cada vez mayor de conocer este perfil de efectos secundarios en particular, y estudiar otras opciones profilácticas y terapéuticas, ya que conllevan un manejo diferente y único al de los fármacos quimioterapéuticos clásicos (Zawitkowska et al., 2019).

La relación entre el sistema inmunitario y el cáncer es compleja. Hasta la fecha sabemos que el sistema inmunitario no solo es capaz de controlar las enfermedades infecciosas, sino que también juega un papel importante en la evolución del cáncer. La prueba inicial de este concepto se encontró en pacientes con condiciones de inmunodeficiencia que, en comparación con la población general, desarrollaron más enfermedades malignas (Alsuwaigh et al., 2019).

Las células tumorales pueden utilizar una variedad de recursos para escapar del sistema inmunitario. Esto nos lleva a un proceso de tres etapas llamado inmunoedición, siendo estas: eliminación, edición y escape. En la primera fase llamada Eliminación, las células malignas transformadas son destruidas por un sistema inmunitario competente (Kumar & Abbas, 2021). No obstante, las células tumorales esporádicas que logran sobrevivir a la destrucción inmunitaria pueden entrar en una fase de equilibrio en la que se produce la edición, en la que estas células pueden adoptar un nuevo fenotipo (León-Sicairos & Picos, 2010), y establecen un microambiente tumoral inmunosupresor. El escape de células tumorales puede ocurrir a través de diferentes mecanismos que incluyen: reconocimiento inmunológico reducido, mayor resistencia o supervivencia, o desarrollo de un microambiente tumoral inmunosupresor. Cada día aprendemos más sobre estos mecanismos, brindándonos la oportunidad de bloquearlos para que el sistema inmunológico vuelva a estar activo (Kumar & Abbas, 2021; Suchato, 2015).

La inmunoterapia se está convirtiendo en un pilar esencial para el tratamiento contra el cáncer. Diversos medicamentos nuevos están bajo investigación y muchos otros ya han sido aprobados para el tratamiento de una gran variedad de procesos neoplásicos (Reyes et al., 2020). Actualmente, los inhibidores del punto de control inmunitario son, con mucho, los más desarrollados, incluidas las terapias exitosas que inhiben la vía de la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la vía de la proteína de muerte celular programable 1 (PD-1)/PD-L1. Otros medicamentos bajo investigación incluyen inhibidores de OX-40, LAG-3 y TIM-3 (Pettitt et al., 2012; Reyes et al., 2020). A diferencia de la quimioterapia convencional, la inmunoterapia mejora la respuesta inmunitaria antitumoral al bloquear a los inhibidores los puntos de control inmunitarios

y permitir que nuestro propio sistema inmunitario luche contra las células tumorales. La activación óptima de células T citotóxicas (TCD8+) requiere dos señales distintas: la unión del receptor de células T (TCR) al antígeno afín presentado por las células presentadoras de antígeno (APC), seguida de la unión de los ligandos CD80 y CD86 en las APC con el receptor coestimulador CD28 en las células T. Sin embargo, nuestro sistema inmunológico debe tener un mecanismo de desactivación para crear tolerancia y evitar reacciones autoinmunes. Una vez que se activa el TCD8+, se regula positivamente la expresión de CTLA-4. Esta proteína es un homólogo de CD28 que contrarresta la actividad de CD28 uniéndose tanto a CD80 como a CD86 con mucha mayor afinidad que la de CD28, y posteriormente regula a la baja la activación de las células T (Suárez Casillas, 2020). En este contexto, ipilimumab fue el primer CTLA-4 inhibidor de puntos de control a desarrollar (Cameron, Whiteside, & Perry, 2011).

Posteriormente, se han identificado otros puntos de control inmunitarios responsables de la activación/desactivación de las células T. PD-1 es un regulador negativo de la actividad de las células T dentro de los tejidos periféricos y el microambiente tumoral. Cuando PD-1 interactúa con sus ligandos PD-L1 o PD-L2, regula a la baja respuesta efectora de estas células en los tejidos periféricos. Las células cancerosas pueden usar este mecanismo para crear inmunidad y resistencia en el microambiente tumoral. Se han introducido nuevos medicamentos desarrollados que bloquean la unión PD-1/PDL-1, creando un antitumoral mejorado para que actuase la respuesta inmune (Inaba & Pui, 2019).

Se han diseñado anticuerpos monoclonales (mAb) para bloquear estas moléculas: ipilimumab y tremelimumab, que son mAbs que inhiben CTLA-4, nivolumab y pembrolizumab bloquean PD-1; y atezolizumab, avelumab y durvalumab son anti-PDL-1. Actualmente, se han aprobado fármacos para el tratamiento de múltiples tipos de cáncer. Ipilimumab fue el primer fármaco en demostrar eficacia en un ensayo clínico aleatorizado de fase III para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico (Inaba & Pui, 2019; Reyes et al., 2020).

Aunque se toleran bien, los inhibidores de puntos de control inmunitarios tienen un perfil de eventos adversos distinto al de la quimioterapia convencional. Estos

medicamentos provocan toxicidad conocida como reacciones adversas relacionadas con el sistema inmunitario, que ocurren de forma secundaria a la respuesta inmunitaria mejorada que provocan los fármacos. Hasta donde sabemos, los pacientes con cáncer son vistos con frecuencia en el Departamento de Emergencia debido a la toxicidad relacionada con el tratamiento, por lo que existe una necesidad cada vez mayor de aprender sobre este perfil de efectos secundarios, dado que implican una gestión distinta y única a la de los clásicos fármacos de quimioterapia (Inaba & Pui, 2019; Martín et al., 2021; Reyes et al., 2020; Suárez Casillas, 2020).

La Lactoferrina (LF), es una proteína multifuncional y es considerada parte de la respuesta inmune no específica de mamíferos. Cabe destacar que entre sus múltiples funciones sobresale su actividad como microbioestático, microbicida de amplio espectro, antitumoral y antioxidante. Además, por el hecho de contener Fe se ha postulado como una proteína de gran valor nutricional (León-Sicairos & Picos, 2010). Entre sus múltiples funciones destacan su papel como microbicida y antitumoral, funciones que describiremos más adelante (León-Sicairos & Picos, 2010). Antes debemos dejar en claro que es el cáncer, y lo abordaremos en la siguiente sección, pero desde el punto de la biología celular.

## **B. Cáncer**

### **1. Definición**

El cáncer no es una enfermedad única; es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la presencia de células que no responden a los controles normales de división (Pierce 2009). Es un conjunto de enfermedades crónico-degenerativas (existen más de 100 tipos diferentes de cáncer), provocadas por factores genéticos heredados o externos, en las cuales el organismo produce masas anómalas de tejido (puesto que al hablar de cáncer también se habla de “tumores malignos” o “neoplasias malignas”, cuyo crecimiento es prácticamente autónomo y superior al de los tejidos

normales. A diferencia de la proliferación de células no neoplásicas, el crecimiento de los tumores persiste después del cese del estímulo inicial. Una definición más reciente incluye la nueva perspectiva según la cual el crecimiento tumoral se ve impulsado por mutaciones adquiridas, que confieren ventaja proliferativa y son transmitidas a la descendencia de forma clonal a partir de una sola célula maligna inicial (Kumar & Abbas, 2021).

## **2. Epidemiología**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, con casi 10 millones de muertes registradas en 2020, casi una de cada seis. Los cánceres más comunes en 2020, por lo que se refiere a nuevos casos, fueron los siguientes tipos de cáncer: mama (2.26 millones de casos), pulmón (2.21 millones de casos), colorrectal (1.93 millones de casos), próstata (1.41 millones de casos), de piel (distinto del melanoma) (1,20 millones de casos); y gástrico (1.09 millones de casos). Los tipos de cáncer que causaron un mayor número de fallecimientos en 2020 fueron los siguientes: pulmón (1.8 millones de defunciones); colo-rectal (916,000 defunciones); hepático (830,000 defunciones); gástrico (769,000 defunciones); y de mama (685,000 defunciones). Cada año cerca de 400,000 niños contraen cáncer en el mundo (OMS, 2020).

En América Latina, el cáncer es la segunda causa principal de muerte en menores de 18 años. En el 2018, se diagnosticaron unos 3.8 millones de casos y 1.4 millones de personas murieron por esta enfermedad. Los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia en los hombres son: de próstata (21.7%), pulmón (9.5%), y colorrectal (8.0%). En las mujeres, los cánceres más frecuentes son: de mama (25.2%), pulmón (8.5%), y colorrectal (8.2%). Si no se tomará acción, se prevé que para el 2030, el número de personas recién diagnosticadas con cáncer aumentará en 32% y ascenderá a más de 5 millones de personas por año en las Américas (OPS, 2020).

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte y según estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer, cada año se suman más de 128,000 nuevos casos en México. Entre enero y agosto de 2020 se registraron 683,823 defunciones, de las cuales 9% se deben a tumores malignos (60,421). Un año antes, en 2019, se registraron 747,784 defunciones, de las cuales 12% se deben a tumores malignos (88,683). En México durante 2017, de cada 100 egresos hospitalarios por cáncer (tumores malignos), en la población de 0 a 19 años de edad, 73 son en tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados. Como parte de esta clasificación se encuentra la leucemia linfóide que, por sí sola, representa 61% (24,851) del total de egresos por cáncer (40,679) en este grupo de población (de Martel et al., 2020; INEGI, 2021; OMS, 2019).

Los tipos de cáncer más frecuentes en la población mexicana de 0-19 años de edad en hombres fueron: de tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados (73%); sistema nervioso central (6%); hueso o cartílago (5%); tejido conectivo y blando (3%), y órganos digestivos (2%). En mujeres de 0-19 años de edad fueron: Tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados (73%), sistema nervioso central (7%), hueso o cartílago (4%), tejido conectivo y blando (3%), y órganos digestivos (1 %). Del total de jóvenes con neoplasias en órganos hematopoyéticos, 61% son por leucemia. Este cáncer puede ser agudo o crónico siendo más frecuente el primero en niños y adolescentes por leucemia linfoblástica aguda y en menor proporción la mielóide aguda (INEGI, 2021; WHO, 2021).

La leucemia ocurre con mayor frecuencia en adultos mayores de 55 años, pero es el cáncer más común en niños menores de 15 años. Entre los adultos, los tipos más comunes son CLL (35 %) y AML (32 %). Entre los niños y adolescentes, la LLA es la más común y representa el 75% de los casos de leucemia pediátrica (de Martel et al., 2020; INEGI, 2021). A nivel mundial, se estima que cada año se diagnostican 440,000 nuevos casos de leucemia junto con 310,000 muertes. Las tasas de supervivencia varían sustancialmente según el subtipo de leucemia, desde una tasa de supervivencia relativa actual a cinco años del 27% para adultos diagnosticados con AML al 86 %

para aquellos con CLL, y del 66 % para niños, adolescentes y adultos jóvenes diagnosticados con AML a 92 % para aquellos con ALL (WHO, 2019; WHO, 2021).

### **3. Fisiopatología**

Al cuerpo humano lo compone muchos tipos de células. El crecimiento y la maduración celular son eventos normales en el desarrollo de los órganos durante la embriogénesis, y también el crecimiento, la reparación y la remodelación de tejido después de una lesión. La regulación alterada de estos procesos puede dar por resultado pérdida del control sobre el crecimiento, la diferenciación y el confinamiento espacial de las células. Las neoplasias de seres humanos representan en conjunto un espectro de enfermedades caracterizadas por crecimiento e invasión anormales de células. Aun cuando los cánceres de manera típica se clasifican con base en sus tejidos de origen o localización anatómica, muchos tipos comparten características similares. También hay considerable variación entre pacientes que tienen un determinado tipo de cáncer, tanto en la naturaleza de las alteraciones celulares, así como en la presentación clínica y la evolución de la enfermedad. El reconocimiento de enfermedad maligna manifiesta por medio de examen físico o estudios de imágenes y requiere la presencia en el organismo de alrededor de 1,000 millones de células malignas. A veces puede reconocerse una fase preclínica. Los signos preclínicos por lo general constan de entre otros, pólipos en el colon o nevos displásicos en la piel, precursores potenciales de carcinoma de colon y melanoma maligno, de manera respectiva. Esas lesiones precursoras por lo general muestran datos de proliferación celular anormal sin la demostración de invasividad, y pueden preceder por meses a años a la aparición de una enfermedad maligna invasiva, o no progresar hacia células cancerosas durante la vida del individuo (Kumar & Abbas, 2021; Moasser, 2015; Suchato, 2015).

Con mayor frecuencia, la fase preclínica no se detecta sino hasta que ya hay cáncer invasor, de manera ocasional con metástasis regionales o a distancia. Como ocurre con otros trastornos médicos, el entendimiento de la fisiopatología de la neoplasia se

ha basado en observaciones clínicas y anatómo-patológicas de series grandes de paciente. Recientemente, se han descrito las características celulares y moleculares de células cancerosas, su relación con ciertas entidades, así como situaciones clínicas neoplásicas, lo cual ha extendido el conocimiento en este campo, precursores potenciales de carcinoma de colon y melanoma (Kumar & Abbas, 2021; Moasser, 2015; Suchato, 2015).

#### **4. Clasificación**

Existen diversos tipos de neoplasias se clasifican a grandes rasgos según su comportamiento clínico:

- **Benignos**, con comportamiento benigno, caracterizados por lesión localizada, sin diseminación a otras localizaciones y susceptibles de resección quirúrgica; el paciente normalmente sobrevive, aunque hay excepciones.
- **Malignos**, a los que se hace referencia como cánceres, con comportamiento agresivo, que incluye invasión y destrucción de tejidos adyacentes y capacidad de diseminación a otras localizaciones (metástasis).

Todos los tumores tienen dos componentes básicos:

- Expansiones clonales de células neoplásicas que constituyen el parénquima tumoral.
- Estroma de soporte compuesto por tejido conjuntivo no neoplásico y vasos sanguíneos; el abundante estroma colágeno se denomina desmoplasia y este tipo de tumores son duros (esfirros).

Los tumores **malignos** se clasifican de la siguiente manera:

- Carcinomas derivados de células epiteliales.
- Sarcomas con origen en células mesenquimatosas.

- Tumores mesenquimatosos de células formadoras de sangre, que se denominan leucemias, y tumores de linfocitos o sus precursores, que reciben el nombre de linfomas (Kumar & Abbas, 2021).

Se conocen algo más de 60 protooncogenes y 20 genes supresores. Los primeros estimulan normalmente la división celular, como hecho fundamental para mantener la vida. De ellos depende el desarrollo embrionario, la cicatrización de las heridas y la reposición de las células, que normalmente envejecen y mueren luego de cumplida su diferenciación. Pero esos mismos protooncogenes pueden sufrir alteraciones en su estructura, por cambios en la secuencia de los ácidos nucleicos (mutaciones), por pérdida de algunos segmentos del cromosoma (deleciones) o por traslado de un sector cromosómico a otro cromosoma (translocaciones).

En general, a estos genes se los clasifica como:

- Genes que estimulan las transcripciones en el ámbito nuclear.
- Genes de factores de crecimiento o sus receptores.
- Genes de proteínas de señales intracitoplasmáticas

## **5. Factores de riesgo**

La contaminación del aire, la alimentación poco saludable, la inactividad física y el tabaquismo y alcoholismo aumentan el riesgo de cáncer y otras enfermedades no contagiosas. Las infecciones carcinógenas, particularmente las causadas por *Helicobacter pylori*, los papilomavirus humanos, los virus de la hepatitis B y de la hepatitis C y el virus de Epstein-Barr, representan aproximadamente el 13% de todos los casos de cáncer diagnosticados en el mundo en 2018 (WHO, 2021). Los virus de la hepatitis B y C y algunos tipos de papilomavirus humanos aumentan el riesgo de contraer cáncer de hígado y cáncer de cuello uterino, respectivamente, mientras que la infección por el VIH multiplica por seis el riesgo de contraer un cáncer de cuello

uterino y aumenta sustancialmente el de otros tipos de cáncer, como el sarcoma de Kaposi (de Martel et al., 2020).

### C. Leucemia

Las neoplasias de células germinales, neuroendocrinas y mesenquimatosas explican una gran parte de los tumores de la infancia y adolescencia, porque estas células se dividen de manera más activa y por ende son más vulnerables a eventos mutacionales. Las células mesenquimatosas, en virtud de su función; se encuentran distribuidas en todo el organismo, y los tumores mesenquimatosos pueden surgir en cualquier sitio anatómico. Las neoplasias hematológicas son parte de la clasificación de neoplasias mesenquimatosas; consideradas enfermedades malignas de células derivadas de precursores hematopoyéticos. La célula madre hematopoyética verdadera tiene la capacidad de autorrenovación, y de dar lugar a precursores (unidades formadoras de colonias) que proliferan y muestran diferenciación terminal hacia una de cualquier línea. Las diferentes neoplasias hematológicas pueden surgir a partir de cada uno de los tipos de células maduras. Gran parte de estas células se originan en la médula ósea, se transportan hacia la circulación sanguínea, y tienen la capacidad de infiltrar órganos y tejidos. Otras tantas tienen la posibilidad de formar tumores en tejido linfoide, en particular los *linfomas*, que se originan a partir de los linfoblastos. La línea de una célula hematopoyética y el grado de diferenciación a lo largo de esa línea muestran vínculo con la expresión de proteínas características de superficie celular, muchas de las cuales son receptores, otras son moléculas de adhesión y proteasas, y algunas más son de función desconocida. Los antígenos de grupos de diferenciación (CD, del inglés *clusters of differentiation*) se han convertido en recursos diagnósticos esenciales en el manejo de neoplasias hematológicas, y algunos tipos de enfermedades malignas se definen por modelos de expresión de CD característicos (Kumar & Abbas, 2021). La ultra-estructura celular y la maquinaria de la célula maligna pueden semejar un poco las de su célula de origen. Es notorio que los datos típicos de estas neoplasias son un

índice proliferativo incrementado, y detención de la diferenciación. El examen del núcleo de las células en interfase a veces puede revelar anomalías cromosómicas, como deleciones (monosomía), duplicaciones (trisomía) o translocaciones balanceadas. Ciertos tipos de neoplasias hematológicas tienden a mostrar anomalías cromosómicas estereotípicas. Dada su naturaleza clonal, estas anomalías serán evidentes en todas las células malignas. En algunos casos de translocación cromosómica, se forma un nuevo gen de fusión y puede suscitar la producción de una proteína de fusión que posee función anormal en comparación con los productos de gen originales. Esta función por lo general involucra pérdida del control del ciclo celular, transducción de señal anormal, o expresión de gen reprogramada como resultado de un factor de transcripción aberrante. En contraste con los tumores sólidos, muchas enfermedades malignas hematológicas están enlazadas de modo específico a ciertas translocaciones cromosómicas; por tanto, los estudios de cariotipo son esenciales en el diagnóstico de enfermedades malignas hematológicas.

Por otro lado, los tumores sólidos a menudo contienen muchísimas anomalías cromosómicas que no son específicas para la enfermedad, o incluso reproducibles. Otros cambios genéticos descritos en las enfermedades malignas hematológicas son mutaciones o deleciones de los genes supresores p53, retinoblastoma (Rb), y tumor de Wilms (WTI), y mutaciones activadoras en el oncogén N-ras. Otros cambios genéticos pueden detectarse en la evolución clonal de leucemias conforme la enfermedad progresa hacia una forma más agresiva en la evolución del paciente. Este dato apoya más la teoría de que la neoplasia es el resultado de alteraciones genéticas por pasos que corresponden a la adquisición secuencial de cambios fenotípicos adicionales que favorecen el crecimiento anormal, la invasión, y la resistencia a las defensas del huésped normales (Kumar & Abbas, 2021; Suchato, 2015).

## **1. Definición y clasificación de Leucemias**

La leucemia es un cáncer de la médula ósea y del sistema linfático, y afecta tanto a niños como a adultos. En la leucemia, las células anormales producidas por la médula ósea comienzan a superar y reemplazar las células normales de la sangre y la médula. Hay cuatro tipos principales de leucemia, cada uno llamado así por la velocidad a la que la enfermedad se desarrolla y empeora, así como el tipo de glóbulo afectado (Suchato, 2015).

*La Leucemia mieloide aguda (LMA):* es un cáncer de crecimiento rápido que comienza en las células mieloides, el precursor de los glóbulos rojos, las plaquetas (células que coagulan la sangre) o los glóbulos blancos conocidos como granulocitos; también conocida como leucemia mielógena aguda o mieloblástica.

*La Leucemia mieloide crónica (LMC):* es un cáncer de crecimiento más lento que comienza en las células mieloides, el precursor de los glóbulos rojos, las plaquetas (células que coagulan la sangre) o los glóbulos blancos conocidos como granulocitos; también conocida como leucemia mielógena crónica o mieloblástica.

*La Leucemia linfocítica aguda (LLA):* es un cáncer de crecimiento rápido, comienza en las células linfoides, que producen diferentes tipos de glóbulos blancos; también conocida como leucemia linfoblástica aguda.

*La Leucemia linfocítica crónica (LLC):* es un cáncer de crecimiento más lento que comienza en las células linfoides, que producen diferentes tipos de glóbulos blancos; también conocida como leucemia linfoblástica crónica (Inaba & Pui, 2019).

La *Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)* representa del 75% al 80% de todos los casos de leucemia infantil; la leucemia mieloide aguda (LMA) comprende del 15% al 20%. Aproximadamente el 85% de TODOS los casos son de linaje B (B-LLA) y el 15% son de linaje T (T-LLA) (Suchato, 2015).

Volviendo con la LLA, ésta un cáncer altamente maligno de las células progenitoras linfoides en la médula ósea, que se caracteriza por la expansión incontrolada de blastos leucémicos. Todo se puede dividir en diferentes subtipos determinados por la

edad (adultos frente pediátrica), origen del linaje (T- contra B-ALL), los hallazgos inmunológicos (pro-, pre-, común y madura B-ALL, resp. Temprano, timo, y los hallazgos T-ALL) y genéticos maduros (es decir, BCR-ABL positivo o negativo) (Lang, Wojcik, & Rieger, 2015).

## **2. Fisiopatología de las leucemias**

Existen diferentes tipos de leucemia, una de las más comunes en niños es *leucemia linfoblástica aguda* (ALL) que es un cáncer que afecta los glóbulos blancos. En este tipo de leucemia hay demasiados glóbulos blancos inmaduros en la médula ósea. Estas células desplazan a los glóbulos blancos normales. Sin una cantidad suficiente de glóbulos blancos normales, el cuerpo tiene más dificultad para combatir las infecciones. La ALL afecta un tipo de glóbulo blanco llamado linfocito, haciendo que se acumulen en el hígado, el bazo y en los ganglios linfáticos.

La leucemia es causada por alteraciones secuenciales en proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes de microARN de las células madre hematopoyéticas o sus progenitores comprometidos. Estos cambios fundamentales alteran los procesos reguladores clave en las células diana dando rienda suelta a una capacidad ilimitada para la auto-renovación, subvirtiendo los controles de proliferación normales, bloqueando la diferenciación celular, y la promoción de la resistencia a las señales de muerte (apoptosis) (Pui, 2009).

## **3. Factores de Riesgo para leucemias**

La leucemia linfocítica aguda (ALL) tiene pocos factores de riesgo conocidos (Inaba & Pui, 2019). A continuación, brevemente se describen:

### **a) Radiación**

Un factor de riesgo para la ALL y la AML es la exposición a altos niveles de radiación. El tratamiento del cáncer con radioterapia aumenta el riesgo de desarrollar leucemia, aunque esto ocurre con mayor frecuencia en AML que en ALL. La utilización de quimioterapia y radiación en el tratamiento parece aumentar el riesgo. No se ha proporcionado información detallada sobre los riesgos de la leucemia causados por la exposición a niveles mínimos de radiación, como pueden provocar algunos estudios de imagen, como los rayos X o la tomografía computarizada (CT). Aunque no es del todo evidente, la exposición a dicha radiación aumenta el riesgo de desarrollar leucemia. La mayoría de los médicos intentan minimizar la exposición a la radiación durante estos estudios por razones de seguridad, especialmente en niños y mujeres embarazadas (Inaba & Pui, 2019)

### **b) Sustancias químicas**

Una mayor exposición a quimioterapéuticos y otros químicos, como el benceno, puede aumentar el riesgo de padecer ALL. Muchas industrias utilizan benceno para producir otros productos, así como en el humo del cigarrillo, algunos pegamentos, detergentes, materiales de arte y disolventes de pintura. La exposición a sustancias químicas está más relacionada con un mayor riesgo de AML en comparación con la ALL (Inaba & Pui, 2019).

### **c) Infecciones virales**

Aunque infrecuentes, las infecciones por el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) puede ocasionar un tipo de ALL de células T, las cuales, la mayoría de los casos se han documentado en Japón y el Caribe. Mientras que en los Estados Unidos,

esta enfermedad no es común. Por otro lado, el virus de Epstein-Barr (EBV) ha sido relacionado con el linfoma de Burkitt y una forma de la enfermedad de Alzheimer (ALL) en África (Inaba & Pui, 2019).

#### **d) Síndromes genéticos**

Parece que la leucemia linfocítica aguda (ALL) no tiene un factor genético significativo. La ALL parece no afectar con mayor frecuencia a algunas familias, por lo que el riesgo individual no aumenta si uno de los miembros de la familia padece la enfermedad (a excepción de los gemelos idénticos, consulte más adelante). No obstante, hay algunos síndromes genéticos (que se pueden heredar de uno de los padres) que parecen aumentar el riesgo de padecer ALL (Inaba & Pui, 2019). Estos comprenden:

- Síndrome de Down
- Síndrome de Klinefelter
- Anemia de Fanconi
- Síndrome de Bloom
- Ataxia-telangiectasia
- Neurofibromatosis
- Síndrome de Li-Fraumeni (Inaba & Pui, 2019).

#### **e) Edad**

La ALL es más prevalente en infantes y adultos mayores de cincuenta años (Inaba & Pui, 2019).

#### **f) Raza/grupo étnico**

Aunque no están claras las razones, la ALL es más frecuente en población blanca que en las negras (Inaba & Pui, 2019).

**g) Incidencia según el sexo**

La ALL es un poco más frecuente en los hombres que en las mujeres (Inaba & Pui, 2019).

**h) Gemelo idéntico con ALL**

Existe un mayor riesgo de desarrollar ALL para quien tiene un gemelo idéntico durante el primer año de vida (Inaba & Pui, 2019).

**i) Factores de riesgo desconocidos, no comprobados o en discusión**

- Exposición a campos electromagnéticos (como usar teléfonos celulares o vivir cerca de líneas eléctricas)
- Exposición al diésel, la gasolina, los pesticidas y algunas otras sustancias químicas en el trabajo
- Tabaquismo.
- Exposición a colorantes capilares

Actualmente, ninguno de estos factores se ha relacionado de manera concluyente con la ALL, para poder hacer afirmaciones más contundentes es necesario la realización de más estudios (Inaba & Pui, 2019).

#### **4. Datos y cifras del cáncer infantil**

En 2018, hubo 18.1 millones de casos nuevos de cáncer y 9.5 millones de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo. Si bien la incidencia general de cáncer es menor en los países de ingresos bajos y medianos (LMIC) en comparación con los países de ingresos altos (HIC), aproximadamente el 70 % de las muertes por cáncer ocurren en los LMIC (Mattiuzzi & Lippi, 2019; OMS, 2019). Se espera que la carga mundial de cáncer aumente a 23.6 millones de casos nuevos por año para 2030 (Ma et al., 2019).

La incidencia del cáncer infantil ha ido en aumento con el tiempo y una proporción cada vez mayor de esta carga recae sobre los países de ingresos bajos y medianos. En 2008, hubo 175,058 nuevos casos de cáncer infantil en todo el mundo, aunque las estimaciones reales probablemente fueron mucho más altas debido a problemas continuos con el diagnóstico y el registro insuficientes (Mathur et al., 2020). Un estudio reciente basado en simulación estimó que en 2015 se produjeron en todo el mundo 397 000 casos nuevos de cáncer infantil, incluidos casos diagnosticados y no diagnosticados (Ward, Yeh, Bhakta, Frazier, & Atun, 2019). Un análisis del estudio Global Burden of Disease estimó una incidencia global de 416 500 casos nuevos de cáncer infantil en 2017 (Force et al., 2019). Dado que las poblaciones de LMIC tienen proporciones relativas más altas de niños que los HIC, más del 80 % de los cánceres infantiles en realidad ocurren en LMIC (Fung, Horton, Zabih, Denburg, & Gupta, 2019). En 2017, los cánceres infantiles contribuyeron a 11.5 millones de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) a nivel mundial y el 82 % de esta carga afectó a países con índice sociodemográfico bajo, medio bajo y medio (INEGI, 2021).

Entre los niños de 0 a 14 años en los LMIC, las muertes relacionadas con enfermedades transmisibles continúan superando las muertes relacionadas con el cáncer (Magrath et al., 2013). Por lo tanto, los gobiernos de LMIC generalmente han priorizado la asignación de recursos de atención médica a las enfermedades transmisibles en lugar de las no transmisibles (ENT) como el cáncer (Hadley, Rouma,

& Saad-Eldin, 2012; Magrath et al., 2013). Sin embargo, a medida que sus economías se desarrollan, los LMIC experimentan una transición epidemiológica, con una carga decreciente de enfermedades transmisibles y un aumento en la mortalidad por cáncer y otras ENT (Magrath et al., 2013). De hecho, entre 1990 y 2011, entre 106 países de ingresos bajos y medianos, el 80 % de la reducción de la mortalidad infantil se atribuyó a la disminución de las muertes por enfermedades transmisibles (Lozano et al., 2011). Por lo tanto, las ENT, incluido el cáncer, comprenden una proporción cada vez mayor de la mortalidad infantil mundial. De hecho, de 2005 a 2016, el cáncer estuvo entre las tres principales causas de muerte en niños de 5 a 14 años en México, Brasil y China (Fadel et al., 2019).

Las tasas de supervivencia entre los niños diagnosticados con cáncer en los países de ingresos altos que reciben tratamientos multidisciplinarios modernos superan el 80 %. Sin embargo, las tasas de supervivencia del cáncer pediátrico en los LMIC oscilan entre el 10 % y el 50 % (Rodríguez-Galindo et al., 2015). Las razones de esta brecha de supervivencia incluyen presentación tardía, falta de vías de referencia eficientes, abandono del tratamiento, mayor toxicidad del tratamiento y acceso deficiente a la quimioterapia.

## **5. Tratamiento de las leucemias**

Más del 30% de las defunciones por cáncer son prevenibles. Más del 30% de los cánceres se pueden prevenir con un modo de vida sano o mediante inmunización contra las infecciones que los causan (VHB, PVH). Dentro de este porcentaje tienen característica de ser fácilmente detectables, para posteriormente ser tratados y curados sin mayor repercusión. Incluso cuando el cáncer se encuentra en fase terminal, es posible aliviar el sufrimiento del paciente con buenos cuidados paliativos (OMS, 2019).

El óptimo diagnóstico del cáncer de manera efectiva es esencial para un tratamiento adecuado y eficaz, debido a que cada tipo de cáncer necesita un tratamiento particular

de acuerdo con las características o la línea celular de la que se trate, que puede abarcar cirugía, radioterapia o quimioterapia. Los tratamientos empleados para el cáncer infantil consisten dependiendo del tipo de cáncer, estadio y localización y comprenden: cirugía, quimioterapia, radioterapia y, en casos especiales, el trasplante de médula ósea. Recientemente se ha progresado en el tratamiento del cáncer infantil. El tratamiento para la leucemia depende de la edad del individuo, el tipo de cáncer y la gravedad de la enfermedad. En la mayoría de los casos, la quimioterapia es la primera línea de tratamiento para esta enfermedad, aunque algunos pacientes requieren un trasplante de células madre para eliminar la leucemia por completo. La inmunoterapia es una clase de tratamientos que aprovechan el propio sistema inmunitario de una persona para ayudar a eliminar las células cancerosas. Además de los trasplantes de células madre, actualmente existen diez opciones de inmunoterapia para la leucemia aprobadas por la FDA (Inaba & Pui, 2019).

#### **j) Anticuerpos dirigidos**

- *Alemtuzumab (Campath®)*: un anticuerpo monoclonal que se dirige a la vía CD52; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC).
- *Blinatumomab (Blincyto®)*: un anticuerpo biespecífico que se dirige a CD19 en las células tumorales, así como a CD3 en las células T; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA).
- *Gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®)*: un conjugado de anticuerpo y fármaco que se dirige a la vía CD33 y administra fármacos tóxicos a las células cancerosas; aprobado para subgrupos de pacientes adultos y pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para CD33.
- *Inotuzumab ozogamicina (Besponsa®)*: un conjugado de anticuerpo y fármaco que se dirige a la vía CD22 y administra fármacos tóxicos a las células cancerosas; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda avanzada (LLA).

- *Obinutuzumab (Gazyva®)*: un anticuerpo monoclonal que se dirige a la vía CD20; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) CD20-positiva, incluso como terapia de primera línea.
- *Ofatumumab (Arzerra®)*: un anticuerpo monoclonal que se dirige a la vía CD20; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) CD20-positiva, incluso como terapia de primera línea.
- *Rituximab (Rituxan®)*: un anticuerpo monoclonal que se dirige a la vía CD20; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC), incluso como tratamiento de primera línea.

### **k) Terapia Celular Adoptiva**

- *Brexucabtagene autoleucl (Tecartus™)*: una inmunoterapia de células T con CAR dirigida a CD19; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA).
- *Tisagenlecleucl (Kymriah®)*: una inmunoterapia de células T con CAR dirigida a CD19; aprobado para subgrupos de niños y adultos jóvenes con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

### **l) Inmunomoduladores**

- *Interferón alfa-2a (Roferin®-A)*: una citocina que se dirige a la vía IFNAR1/2; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia de células pilosas y leucemia mieloide crónica (LMC) con cromosoma Filadelfia positivo.
- *Interferón alfa-2b (Intron A®)*: una citocina que se dirige a la vía IFNAR1/2; aprobado para subgrupos de pacientes con leucemia de células pilosas y linfoma no Hodgkin folicular agresivo.

Aún suele haber efectos secundarios a consecuencia de los diversos tratamientos en pacientes pediátricos que no han podido ser evitados. Los efectos secundarios a largo plazo por el tratamiento tienen una variedad de efectos secundarios, como infección, daño de órganos, hematológicos y otros (desnutrición, pérdida de cabello) (Inaba & Pui, 2019).

La mayoría de los agentes que causan inmunosupresión y mielosupresión aumentan el riesgo de infecciones bacterianas, virales y fúngicas. La infección sigue siendo una de las principales causas de muerte en todos los niños. Todos los órganos pueden verse afectados adversamente por el tratamiento anti-leucémico, siendo la complicación más común la toxicidad gastrointestinal, neuropatía central y/o periférica, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, disfunción cardíaca, toxicidad esquelética (Inaba & Pui, 2019).

A pesar del daño que representa el cáncer en un niño, los efectos a corto, mediano y largo plazo, así como las investigaciones en cáncer infantil son pocas ya que la cifra de casos en adultos supera al de casos infantiles tanto en número de enfermos como en mortalidad; sin embargo, los tipos de cáncer, los tratamientos, equipos empleados, etc. son diferentes, es por ello que está plenamente justificada la investigación y la búsqueda de una mejor terapia (Moody, Meyer, Mancuso, Charlson, & Robbins, 2006; Ngoma, 2006).

Aunque se ha realizado un notable avance en la obtención de nuevos agentes empleados en la quimioterapia la mayoría de ellos son drogas muy tóxicas, que deterioraran físicamente a los pacientes con cáncer y también destruyen las células normales, sobre todo las que se dividen más rápidamente, por lo que los efectos secundarios están relacionados principalmente con estas células que se destruyen. En el caso de los cánceres infantiles se usan frecuentemente combinaciones de cisplatino, vincristina, prednisona etc., agentes que dañan el ADN de las células o bien, dirigen las células a apoptosis. Un hecho alarmante, además de la elevada toxicidad de estos fármacos, es que las células tumorales se vuelven rápidamente resistentes a ellos, o tolerantes, y es necesario emplear dosis muy altas y más de tres agentes quimioterapéuticos en un esquema de tratamiento (Eryilmaz & Canpolat, 2017).

Todo esto ha llevado a la búsqueda de nuevos fármacos naturales o sintéticos seguros, no tóxicos y que no generen efectos a corto y largo plazo, que ayuden a la recidiva, cura y mejor calidad de vida en los pacientes con cáncer. Las investigaciones se han dirigido en torno a compuestos de origen natural que aparte de ser antitumorales, tienen otro tipo de efectos que en gran manera ayudarían a disminuir los efectos primarios del tratamiento del cáncer, que aumentarían la respuesta inmune y que podrían tener propiedades microbicidas y actuar junto con antibióticos y quimioterapéuticos en pacientes con cáncer. La proteína Lactoferrina (LF), una proteína clave en la respuesta inmune innata presenta todas estas características, y es por ello uno de las blancas de mayor estudio como posible antitumoral, microbicida, antioxidante, inmunoregulador, inmunoestimulador etc. (J. Brock, 1980). En la siguiente sección, hablaremos de lactoferrina, desde sus generalidades, estructura, funciones biológicas, hasta sus aplicaciones.

## **D. Lactoferrina (LF)**

### **1. Definición y Generalidades**

Lactoferrina (LF) es una glicoproteína 703 restos de aminoácidos y de aproximadamente 80-kDa, que pertenece a la familia de las Transferrinas, y por ello también une hierro (Fe) (Sørensen & Sørensen, 1939). La LF es una proteína multifuncional y es considerada parte de la respuesta inmune no específica de mamíferos. Cabe destacar que entre sus múltiples funciones sobresalen sus actividades como microbio-estático, microbicida de amplio espectro, antitumoral y antioxidante. Además, por el hecho de contener Fe se ha postulado como una proteína de gran valor nutricional (J. H. Brock, 2002; Sánchez, Calvo, & Brock, 1992; Weinberg & Cook, 2002).

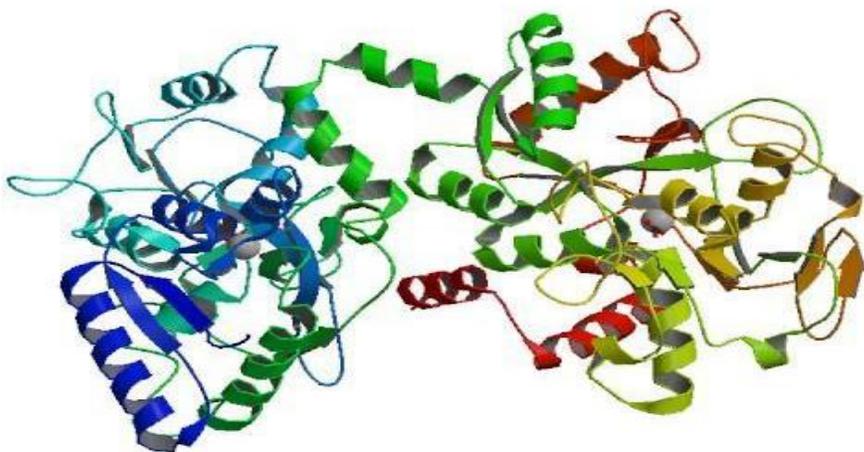
LF posee múltiples funciones biológicas, incluyendo la unión y liberación de hierro y sirve como uno de los componentes importantes del sistema inmune innato, donde actúa como un potente inhibidor de varios agentes patógenos mediante la hipoferremia por infección (Anderson et al., 1987). No sólo es una glicoproteína altamente abundante de la leche materna (Anderson et al., 1987; Moore, Anderson, Groom, Haridas, & Baker, 1997), al ser sintetizada por la glándula mamaria y por las células del acino, es liberada por la mucosa de los tejidos del tracto respiratorio superior e inferior, del aparato digestivo y tejidos de las mucosas urogenitales, que a menudo están expuestos a la colonización por patógenos microbianos invasivos. Se distribuye ampliamente en los fluidos biológicos, tales como la leche, saliva, fluido seminal, en gránulos de los neutrófilos específicos de leucocitos polimorfonucleares, los cuales participan en la respuesta hacia patógenos mediante la inflamación y posteriormente la liberación de la apoLF, por lo que aumenta su circulación en la sangre. También se puede encontrar LF en la bilis, el jugo pancreático, pequeñas secreciones intestinales y el moco cervical (Russell, Bobek, Brock, Hajishengallis, & Tenovuo, 2005). Al igual que la Tf y la ovotransferrina, puede contener Fe (conociéndose, así como holoLf), o bien, encontrarse libre de este metal (se le denomina apoLf en este estado) (E. N. Baker et al., 1991).

## **2. Origen y Estructura**

LF cuenta con una carga neta positiva y pI en el rango de 8,0 a 8,5 (Levay & Viljoen, 1995; Lönnerdal & Iyer, 1995). LF se expresa a partir de un gen de 35 kb conservadas entre diferentes especies de mamíferos (conservación 65-100%) (Anderson et al., 1987; E. Baker & Baker, 2005; Baveye, Ellass, Mazurier, Spik, & Legrand, 1999; Levay & Viljoen, 1995). Como se muestra en la *Figura 1*, LF es una única cadena polipeptídica (monómero), montado en dos globular N- y C-terminales lóbulos simétricos (E. N. Baker et al., 1994). Cada lóbulo contiene dos dominios, denominados N1 y N2, o C1 y C2, que encierran una profunda hendidura en la que el sitio de unión del hierro se

encuentra (Anderson et al., 1987; E. Baker & Baker, 2005; E. N. Baker et al., 1991). Los dos lóbulos están conectados por una región bisagra, lo que da una flexibilidad adicional LF (Gutteridge, Paterson, Segal, & Halliwell, 1981). Cada lóbulo se puede unir un único átomo de metal, tales como el  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  ion, y también el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y  $\text{Mn}^{2+}$  iones (E. Baker & Baker, 2005; Levay & Viljoen, 1995).

Con los ensayos clínicos exitosos, lactoferrina bovina (bLF) ha demostrado ser una glicoproteína multifuncional, ganando la atención como una droga nutracéutica y biológica, con segura focalización de cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas, virales y microbianas (Tsuda et al., 2010).



**Figura 1. Estructura de Lactoferrina humana recombinante diférrica.** Cadenas de proteínas son de color desde el N-terminal a la (espectral) degradado de color C-terminal usando un arcoíris (Sun, Baker, Shewry, Jameson, & Baker, 1999).

LF se compone de ~700 aminoácidos con dos lóbulos simétricos formando una sola cadena polipeptídica. Cada lóbulo está más subdividido en dos dominios que albergan los sitios de unión de hierro (Ebrahim et al., 2014). En su forma natural, monomérica-BLF nativa (NM-BLF) es de aproximadamente 6 a 20% saturado con iones  $\text{Fe}^{3+}$  (Kanwar, Mahidhara, & Kanwar, 2012). El papel de bLF en la homeostasis de

mamíferos hierro, la morfogénesis de órganos, y la reducción de las funciones inmunes innatas y adaptativas ha resultado en sus aplicaciones potenciales en el campo de la medicina, junto con su amplio uso como un nutracéutico actual y un suplemento de alimentos seguros.

### **3. *Lactoferrina y su papel en la respuesta inmune***

*Lactoferrina* (LF) es una glicoproteína fijadora de hierro con múltiples funciones en el organismo, como se muestra en la *Figura 2*. Su participación en procesos apoptóticos en células cancerosas, su capacidad para modular diversas reacciones del sistema inmunitario, y su actividad frente a un amplio espectro de microorganismos patógenos, incluidos los virus respiratorios, la han convertido en una proteína de amplio interés en la investigación y la industria farmacéutica y alimentaria. En esta revisión, nos hemos centrado en describir las funciones más importantes de la lactoferrina y los posibles mecanismos de acción que conducen a su función. Los mecanismos de interacción de la lactoferrina con varios receptores. Están fuertemente ligados a su conformación de glicano; se ha observado que existe una interacción entre algunos Toll Like Receptors (TLRs) y LF, mediada por glicanos de la molécula, permitiendo un efecto inmunomodulador (Figueroa-Lozano et al., 2020; Valk-Weeber, Eshuis-de Ruiten, Dijkhuizen, & van Leeuwen, 2019). LF también juega un papel en la diferenciación, maduración, activación, migración, proliferación, y función de las células que pertenecen a las células presentadoras de antígenos (APC), como las células B, los neutrófilos, los monocitos/macrófagos y las células dendríticas (Kruzel, Zimecki, & Actor, 2017; Dominique Legrand, 2016). Estudios in vitro e in vivo han demostrado que los macrófagos y las células dendríticas son capaces de unirse a LF a través de su interacción con receptores de superficie para LF que inducen su maduración y, por tanto, su actividad funcional (Giansanti, Panella, Leboffe, & Antonini, 2016; Hu et al., 2017; Puddu, Valenti, & Gessani, 2009); además, el efecto de LF en la activación y

diferenciación de monocitos/macrófagos ayuda a reducir la producción de citocinas pro-inflamatorias.

La LF puede modular de forma positiva o negativa a las células del sistema inmune. La presencia de LF exógena produce un aumento en la expresión de citocinas con funciones fundamentalmente pro-inflamatorias como Interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-6, Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- $\alpha$  y Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF), así mismo provoca el decremento en la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Broxmeyer et al., 1987; Guillén et al., 2002; Machnicki, Zimecki, & Zagulski, 1993). Por otra parte, la Lactoferrina tiene un efecto anti-inflamatorio ya que produce un aumento en la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 (Togawa et al., 2002); este efecto lo logra gracias a su capacidad para unir componentes de la pared celular bacteriana como lipopolisacárido (LPS) y a sus receptores celulares (CD14), esto evita el desarrollo de la inflamación causado por la liberación de citocinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (D. Legrand, Ellass, Carpentier, & Mazurier, 2005).

La LF tiene efecto sobre la activación de las células NK (Shau, Kim, & Golub, 1992), leucocitos polimorfonucleares y monocitos (Gahr, Speer, Damerau, & Sawatzki, 1991), también favorece la producción del factor estimulador de colonias (Sawatzki & Rich, 1989), incrementa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (De Sousa, Breedvelt, Dynesius-Trentham, Trentham, & Lum, 1988), regula la mielopoyesis (Gentile & Broxmeyer, 1983), entre otras funciones; sin embargo, no existe un consenso sobre los roles biológicos de la lactoferrina (Fujita, Matsuda, Sekine, Iigo, & Tsuda, 2004). En los últimos años se ha incrementado el número de trabajos que indican que la LF bovina y humana puede tener efectos benéficos para el tratamiento del cáncer. Estudios con varias líneas de células cancerígenas en modelos animales han mostrado efectos benéficos (Vogel, 2012; Zhang, Lima, & Rodrigues, 2014). Se ha utilizado una forma recombinante de lactoferrina humana en ensayos clínicos fase II y fase III para el tratamiento de cáncer de pulmón. En un ensayo clínico controlado se muestra efectos de LF bovina en el bloqueo de crecimiento de pólipos en colon que evolucionan a cáncer. Existen algunos ensayos clínicos donde se ha administrado

lactoferrina bovina (bLF) como profilaxis para sepsis tardía en prematuros y para diarrea en niños con resultados eficaces y de seguridad (Mohan & Abrams, 2009; Ochoa, Pezo, Cruz, Chea-Woo, & Cleary, 2012).

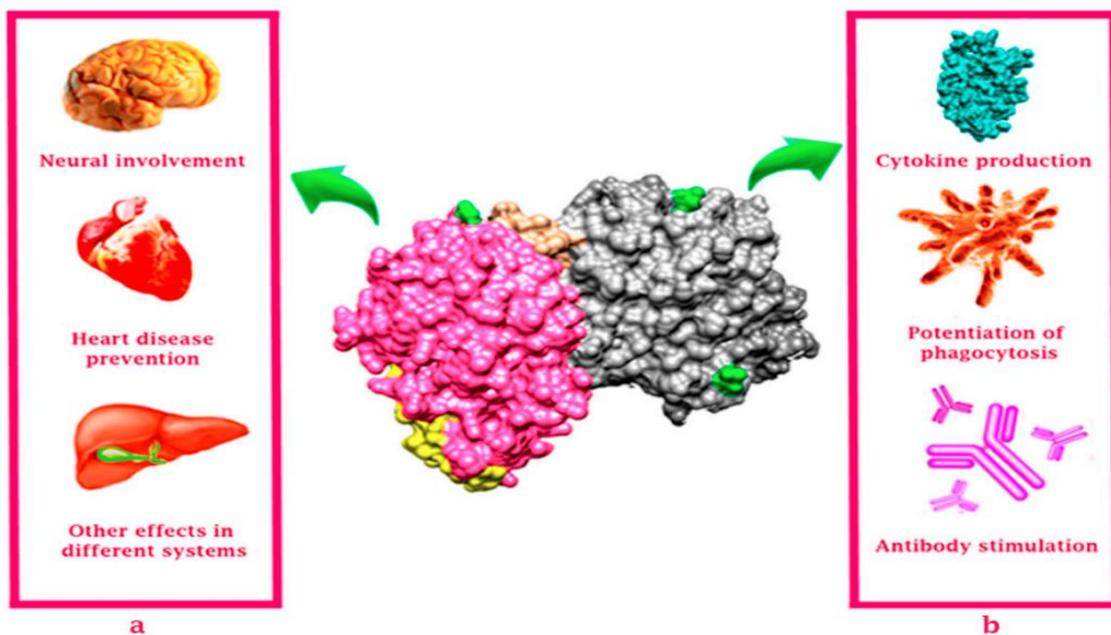
Los pacientes con cáncer y neutropenia severa secundaria a quimioterapia disminuyen considerablemente las concentraciones plasmáticas de factores inmunológicos que participan en la defensa del hospedero, como es el caso de las proteínas defensinas y lactoferrina. Esto se debe a que el número de neutrófilos juega un papel determinante en la secreción de estas proteínas y en el pronóstico de pacientes con algún tipo de malignidad. En la actualidad, a pesar de tener un conocimiento importante sobre los factores de riesgo para la colonización e infecciones sistémicas por bacterias y hongos, no hay protocolos bien establecidos para la prevención de estas complicaciones.

#### **4. *Lactoferrina en Leucemia***

Lactoferrina no solo tiene las propiedades antes mencionadas, sino que también ha demostrado tener efectos sobre ciertos tipos de cáncer, incluyendo la leucemia. De todos los pacientes con cáncer a nivel mundial, solo aproximadamente el 1% corresponde a la cifra de cáncer infantil. El control de esta enfermedad en niños es limitado, como lo son también las investigaciones en profilaxis y terapéutica de estas enfermedades. La leucemia es el cáncer con la mayor prevalencia entre los niños (Bhakta et al., 2019). Actualmente, los tratamientos para diferentes tipos de leucemia, incluida la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfocítica aguda, mejoran la tasa de supervivencia en niños diagnosticados, sin embargo; las consecuencias a largo plazo pueden manifestarse como enfermedades cardiovasculares que aumentan el riesgo de muerte (Eryilmaz & Canpolat, 2017; Gibson et al., 2016). En este sentido, una vez más, LF podría ser una alternativa que minimice los efectos secundarios en los pacientes, ya que se demostró que inducir la apoptosis en la leucemia (Lee, Hwang, Pyo, Hahm, & Choi, 2010; Nakamura-Bencomo et al., 2021). De la misma manera que LF ha sido probado con éxito para el tratamiento de cánceres, principalmente cáncer de mama, tanto LF como derivados bioactivos de LF péptidos se han utilizado con

éxito en el tratamiento de otros tipos de cáncer como leucemia. Además, se demostró que el péptido PRF, un fragmento de hLF, también tiene actividad antitumoral. Este péptido mostró inducción de muerte celular en células de leucemia, causando un efecto necrótico. Además, el péptido PRF indujo la detención del ciclo celular G0/G1. Otro el péptido de bLF, lactoferrina B, ejerce un potente efecto citotóxico sobre Jurkat y CCRF-CEM Células T de leucemia. Adicionalmente, puede aumentar la expresión de caspasa-3, promoviendo Fragmentación del ADN y, por tanto, vía de apoptosis en la célula de leucemia HL-60 línea (Gómez Gallego, Pérez Conesa, Bernal Cava, Periago Castón, & Ros Berruezo, 2009). Estos estudios concuerdan con los nuestros, donde hemos reportado que también aparte de la bLF y la hLF, los péptidos derivados de bLF también inducen muerte celular, siendo el péptido LF quimera el que presenta una mayor actividad (Arredondo-Beltrán et al., 2023).

Por todos estos resultados, nos propusimos el siguiente planteamiento del problema que se detalla en la página posterior al resumen de las actividades biológicas de la LF en el organismo humano (Figura 2).



**Figura 2. Representación esquemática de los efectos de la lactoferrina en el organismo. (a)** Patogénesis no dependiente de las actividades de LF; LF tiene

implicaciones en el neurodesarrollo y algunas lesiones neurodegenerativas y puede estar involucrada en la prevención de enfermedades del corazón debido a su efecto sobre los niveles de acumulación de lipoproteínas. Puede ejercer efectos sobre la actividad metabólica en diferentes sistemas. **(b)** Patogénesis dependiente de las actividades de LF; LF puede promover la producción de citoquinas, mejorar la fagocitosis y estimular la producción de anticuerpos y varias vías de señalización, en respuesta a diversas enfermedades como infecciones o cáncer. Los posibles sitios de glicosilación se muestran en verde (Asn-138, Asn-479 y Asn-624), y el péptido de lactoferricina se muestra en amarillo (aminoácidos 17–41). El lóbulo N-terminal (aminoácidos 1-332) se muestra en rosa y el lóbulo C-terminal (aminoácidos 344-703) se muestra en gris.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es la segunda causa de menores de 18 años de edad después de los accidentes en países como el nuestro. La problemática es muy clara ante una enfermedad tan prevalente como lo es el cáncer en la población pediátrica, ya que se presenta en 400,000 pacientes de entre 0 y 19 años cada año, siendo la leucemia el diagnóstico más común de estas (61% de los diagnósticos de cáncer totales). A pesar de los vastos avances en la terapia contra la leucemia, la alta toxicidad de quimioterapias y radioterapias en los procesos de inducción y primeras semanas de exposición, aunado a las infecciones concomitantes adquiridas por la inmunosupresión inducida por quimioterapéuticos en pro al tratamiento de leucemia, son la primera causa de muerte. Es aquí donde surge la necesidad de buscar un tratamiento paralelo y adyuvante para estimular, fortalecer, o modular el sistema inmunitario en pacientes inmunosuprimidos como consecuencia de los quimioterapéuticos y estrategias complementarias utilizadas para combatir la leucemia, que permita restablecer los niveles de leucocitos sanos, ayudando de manera autónoma y de forma interna a combatir el cáncer y la amenaza contra virus, bacterias y hongos que pasan de ser una infección con un periodo de evolución de 7 a 10 días en un paciente sano, a una enfermedad mortal en un paciente oncológico en tratamiento, en medio de una lucha por la vida contra el cáncer.

### III. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se enfocará en el estudio de la posible actividad inmunomoduladora de lactoferrina bovina en líneas celulares de leucemia, tanto en la fagocitosis como en la liberación de citosinas ante el reto con la bacteria *Escherichia coli*. Los motivos que nos llevaron a investigar este tema son porque si bien la ciencia ha avanzado enormemente con respecto a la comprensión sobre la fisiopatología de la leucemia y los mecanismos de acción de los quimioterapéuticos adecuados en la enfermedad, así como sus estrategias combinadas (cirugía, radioterapia, trasplante de médula ósea), siguen sosteniendo grandes efectos de toxicidad, problemas con la recidiva, y consecuencias a largo plazo, disminuyendo las probabilidades de un buen pronóstico para estos pacientes. Tomando en cuenta que la leucemia es el cáncer más común en la niñez, surge la necesidad de atacarla desde otro punto, haciendo uso de distintas vías e incluso replantear los tratamientos estandarizados contra enfermedades ya perfectamente conocidas, como son los distintos tipos de leucemias. Con esto, nace la inmunoterapia. No obstante, con estos fármacos nuevos y aún con todo lo reportado con respecto a su eficacia y seguridad, siguen siendo altamente tóxicos para el organismo de los niños tratados, los cuales tienen toda una vida por delante y se hace necesario el encontrar opciones efectivas y certeras, que no sean tóxicas. Si lactoferrina estimula la fagocitosis de bacterias, así como también la liberación de citocinas, se contará con una nueva estrategia que pudiera por un lado ser antitumoral y microbicida, y por lo tanto se contará con un efector de la respuesta inmune innata con potencial para el tratamiento del cáncer infantil.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La lactoferrina bovina y los péptidos interactúan y modulan la respuesta inmune de las células Jurkat y RAW ante una infección por *Escherichia coli*.

## V. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Determinar si Lactoferrina bovina y péptidos intervienen o modulan la respuesta de las líneas celulares RAW 264.7 y células Jurkat ante infección por *Escherichia coli* HB101

### B. Objetivos particulares

1. Establecer la interacción de lactoferrina bovina y péptidos derivados con células Jurkat y células RAW 264.7
2. Evaluar la actividad fagocítica de células RAW 264.7 ante infección con cultivos de *Escherichia coli*
3. Determinar la concentración de citocinas proinflamatorias FNT- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 en células Jurkat, tratadas con lactoferrina bovina ante infección con cultivos de *Escherichia coli*
4. Establecer la concentración de la citocina antiinflamatoria IL-4 en células Jurkat, tratadas con lactoferrina bovina ante infección con cultivos de *Escherichia coli*

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. Lactoferrina bovina y péptidos derivados**

LF bovina (bLF), aproximadamente 20% de saturación de hierro, se adquirió de Abial Biotech (España). La contaminación por LPS y la concentración de hierro se evaluaron antes de ser utilizados (Cutone et al., 2014). Los péptidos derivados de bLF (LFcina 17-20, LFampina 265-285 y LF quimera acoplados a fluorescencia) se recibieron por donación del Dr. Bolscher, del Departamento de Bioquímica oral de la Universidad de Ámsterdam, en Holanda. Las líneas celulares y medios, suero y antibióticos utilizados en este trabajo se adquirieron de la casa comercial American Type Culture Collection (ATCC).

### **B. Reactivos**

El material e insumos de laboratorio se obtuvieron de la casa comercial Sigma Aldrich, medios de la American Type Culture Collection (ATCC), a menos que otra cosa sea indicada en cada caso.

### **C. Establecimiento y tratamiento de las líneas celulares Jurkat y Raw**

Una vez adaptados los diferentes tipos celulares durante 24 h, posteriormente se realizaron los experimentos para determinar si bLF ejercía efectos sobre las células. Este reto consistió en incubar a las células ( $1 \times 10^6$ ) en medio RPMI-1640 sin antibióticos más  $1 \mu\text{M}$  de bLF en cámaras de cultivo. Como control, se establecieron células sin tratar, y todas las muestras se incubaron durante 48 h. Las células se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  a una atm de 5% de  $\text{CO}_2$ . Tras las h de estandarización, y verificar que en esta concentración no había efecto citotóxico, se procesaron las muestras de acuerdo a la metodología que se explica a continuación.

#### **D. Ensayo de endocitosis**

Para el ensayo de endocitosis se estableció previamente el cultivo celular a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Para ello, se depositó esta concentración de células en cada pozo de la cámara de cultivo en medio RPMI y se añadieron los péptidos (LFcina, LFampina y LF quimera, acoplados a FITC) a las concentraciones de  $1 \mu\text{M}$  durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se centrifugó 2 veces en PBS durante 5 min/2,500 rpm. Después de esto, se añadió medio nuevo y se agregó *para*-formaldehído al 4% durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Se centrifugó 2 veces en PBS durante 5 min/2,500 rpm para células Jurkat, para células RAW 264.7 se realizaron 2 lavados con  $300 \mu\text{l}$  de PBS). Finalmente se depositó en portaobjetos de 8 pozos y procesar para microscopía de fluorescencia.

Alternativamente, se realizaron el ensayo de internalización de LF, para inmunofluorescencia indirecta. Se establecieron los cultivos celulares, los cuales se depositaron en medio de cultivo adecuado y se agregó bLF a la concentración antes mencionada durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ , a 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se centrifugó 2 veces para el lavado en PBS durante 5 min/2,500 rpm para células Jurkat, y para células RAW 264.7 se realizaron 2 lavados con  $300 \mu\text{l}$  de PBS. Después, se depositaron en medio nuevo y se agregó *para*-formaldehído al 4% durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se centrifugaron 2 veces en PBS durante 5 min/2,500 rpm para células Jurkat y para células RAW 264.7 se realizaron 2 lavados con  $300 \mu\text{l}$  de PBS. Después se depositaron en medio nuevo, y se agregó Tritón X-100 al 0.05 % durante 10 min en incubadora para permeabilizar las células. Después de esto, las muestras se centrifugaron 2 veces en PBS durante 5 min/2,500 rpm para células Jurkat y para células RAW 264.7 se realizaron 2 lavados con  $300 \mu\text{l}$  de PBS. Se agregó medio nuevo y  $1 \mu\text{l}$  anticuerpo primario anti-lactoferrina (1:100 de Ab anti-LF hecho en conejo) y se depositó en incubadora durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se centrifugaron 2 veces en PBS durante 5 min/2,500 rpm para células Jurkat y para células RAW 264.7 se realizaron 2 lavados con  $300 \mu\text{l}$  de PBS. Se agregó medio nuevo y  $1 \mu\text{l}$  de anticuerpo secundario (1:1000 de Ab anti-conejo hecho en cabra acoplado a Rodamina marca

Zymed) y se depositó en agitación suave durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se centrifugaron 2 veces en PBS durante 5 min/2,500 rpm para células Jurkat y para células RAW 264.7 se realizaron 2 lavados con 300 µl de PBS. Finalmente, las muestras se depositaron en portaobjetos y se sellaron con gelvatol, para posteriormente analizarse y fotodocumentarse bajo microscopía de fluorescencia usando el software Leica Application Suite 3.6 en el microscopio LEICA DM1000 (Heilderberg, Alemania).

### **E. Ensayo de actividad fagocítica de Monocitos (Células RAW).**

Los ensayos se realizaron en placas de cultivo Costar de 96 pozos, se trabajó con una densidad de  $1 \times 10^6$  células para cada tratamiento. Para determinar un posible aumento de la actividad fagocítica en los leucocitos tratados y no tratados con LFB, se procedió a realizar un ensayo de actividad fagocítica frente a la bacteria *Escherichia coli*. Los ensayos de infección con la bacteria *E. coli* se realizaron de la siguiente manera: previo al proceso de infección se realizó el marcaje de la bacteria con el fluoróforo rodamina (TRITC) para evaluar la actividad de fagocitosis. Para esto, se adicionaron 1 µL de rodamina a una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC/ml y se mezcló en shaker a 250 RPM a 37°C, durante 30 min. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X, con centrifugaciones de 13.000 RPM durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1.5 mL de PBS 1X. Después de esto, con la solución final que contenía la bacteria, se reconstituyó finalmente con medio RPMI sin antibiótico para efectuar la infección de los macrófagos presentes en las muestras. Para estos ensayos, se evaluaron y ajustaron diversas concentraciones bacterianas (MOI), así como diferentes intervalos de tiempo de fagocitosis que variaron de 2 hasta 24 h y con multiplicidades de infección de 1:1, 1:10, 1:20, 1:40 en las placas de cultivo de 24 pocillos incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 6 h, las muestras se procesaron, a fin de visualizar y cuantificar la fluorescencia de las células debidas a las bacterias fagocitadas, en cada uno de los tratamientos, para ello, las

muestras se depositaron en portaobjetos y se sellaron con gelvatol, para posteriormente analizarse y fotodocumentarse bajo microscopía de fluorescencia usando el software Leica Application Suite 3.6 en el microscopio LEICA DM1000 (Heilderberg, Alemania).

#### **F. Determinación de la concentración de las citocinas**

La concentración de las citocinas FNT- $\alpha$ , IL-6, IL-2, e IL4, se determinó por medio de kits comerciales de ELISA (Biosource, Vancouver CA), en los sobrenadantes de los cultivos tratados y no tratados como anteriormente se indicó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al finalizar, los resultados se graficaron y se comparó el nivel de cada una con muestras tratadas con bLF, a fin de establecer alguna diferencia significativa en las muestras analizadas.

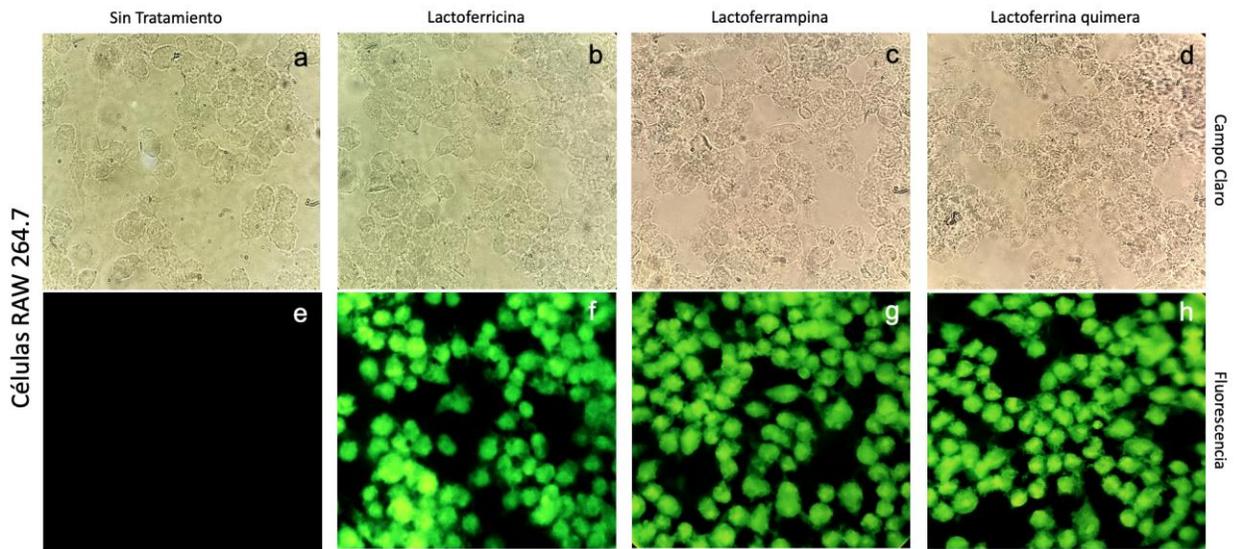
#### **G. Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron por duplicado, para evaluar la significancia estadística de los resultados se aplicó la prueba ANOVA, los resultados serán estadísticamente significativos con un valor de  $P < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

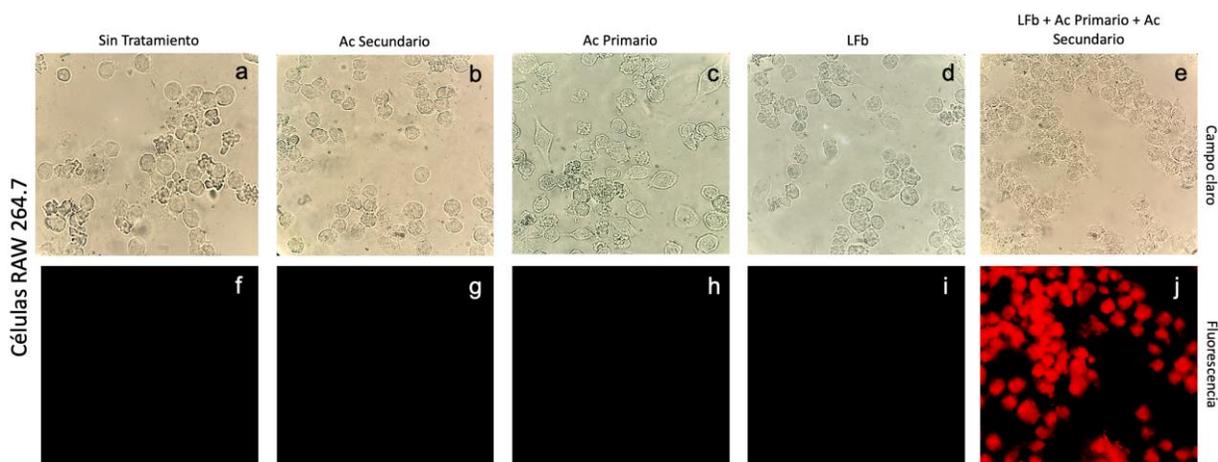
### A. Lactoferrina bovina y los péptidos interaccionan con componentes de membrana de la línea celular de macrófagos RAW 264.7

Primeramente, se corroboró la interacción de bLF y los péptidos con las células RAW 264.7. Para ello se realizó un ensayo de fluorescencia directa utilizando los péptidos acoplados a fluorescencia (FITC, exhibe fluorescencia en color verde) (Figura 3). Como se puede apreciar en la Figura 3, LFcina 17-30 (Panel f), LFampina 265-284 (Panel g) y LF quimera (Panel h), interaccionan con la membrana de las células RAW 264.7, ya que exhiben el color verde característico, una vez que se observaron al microscopio de fluorescencia, teniendo como referencia las células observadas en microscopia de luz (Paneles b, c y d), mientras que los controles: el panel a, muestra el cultivo de células sin tratamiento y el panel e muestra la fluorescencia basal de las células (sin color verde). Esto nos permite apreciar y concluir que los péptidos derivados de la bLF interactúan con componentes presentes en la línea celular RAW 264.7. Por otro lado, en el caso de bLF (Figura 4) se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, lactoferrina fue inmunodetectada en las células RAW 264.7 por el anticuerpo anti-LF y este a su vez se inmuno-detectó utilizando un anticuerpo secundario acoplado a tetra-metil-Rodamina (TRITC), el cual fluoresce en color rojo (Panel j), mientras que el control de células en campo claro se visualiza en el panel e. En el caso de los otros paneles corresponde a los controles (a-d campo claro y f-i). Estos hallazgos nos indican que tanto la LF como los péptidos interaccionan con componentes de células RAW 264.7.



Abreviaturas: Ac, anticuerpos; LFb, Lactoferrina bovina.

**Figura 3. Lactoferrina 17-30-FITC, Lactoferrampina 265-284-FITC y Lactoferrina quimera-FITC interaccionan con células RAW 264.7.** Cultivos de células RAW 264.7 ( $1 \times 10^6$ ) se colocaron en cámaras de cultivo de 8 pozos con medio RPMI. Posteriormente, las células se incubaron con p-formaldehído al 4% durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  y 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Después, las células se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron nuevamente en medio de cultivo (a) conteniendo  $1 \mu\text{M}$  de LFcina 17-30-FITC (b), LFampina 265-284-FITC (c), y LF quimera-FITC (d), durante 1 h, a  $37^\circ\text{C}$  y 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Después de este tiempo, las células se lavaron nuevamente como antes se mencionó. Después de aplicar lavados, las muestras se sellaron con gelvatol para posteriormente analizarse y fotodocumentarse bajo microscopía de fluorescencia usando el software Leica Application Suite 3.6 en el microscopio LEICA DM1000 (Heilderberg, Alemania). Los paneles superiores corresponden a análisis en campo claro (a-d), mientras que las imágenes inferiores corresponden a análisis con fluorescencia (e-h). Barra  $20 \mu\text{M}$ .



Abreviaturas: Ac, anticuerpos; LfB, Lactoferrina bovina.

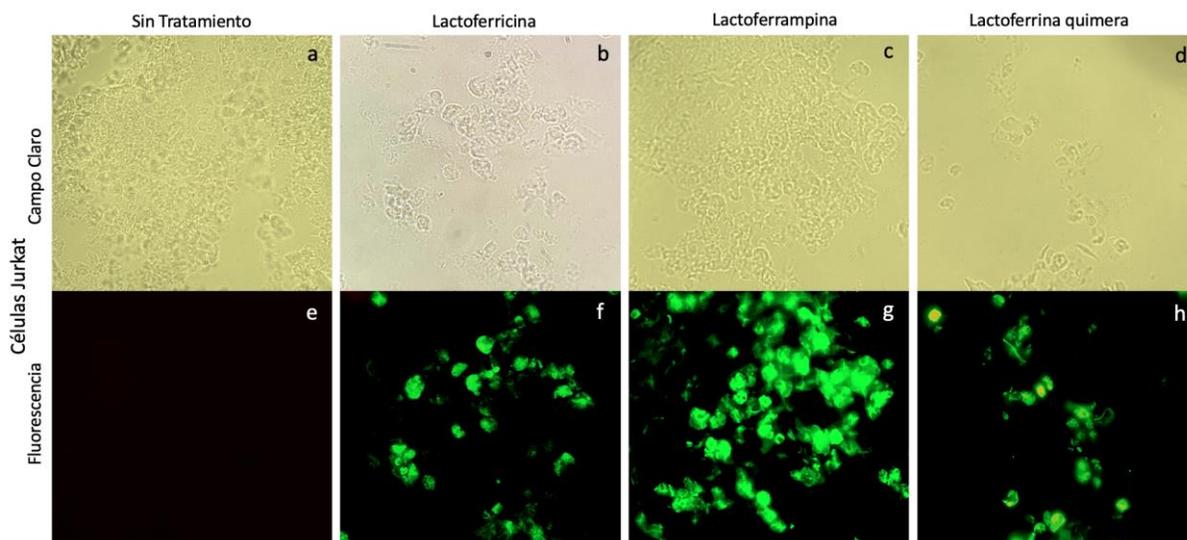
**Figura 4. Lactoferrina bovina interacciona con células RAW 264.7.** Cultivos de células RAW 264.7 ( $1 \times 10^6$ ) se colocaron en pozos de cámaras de cultivo de ocho pozos en medio RPMI. Posteriormente, las células se incubaron con p-formaldehído al 4% durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  y 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Después, las células se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron nuevamente en medio de cultivo (a), conteniendo  $1 \mu\text{M}$  de Lactoferrina durante 1 h, (b-e) a  $37^\circ\text{C}$  y 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Después de este tiempo, las células se lavaron nuevamente como antes y se agregó un anticuerpo anti-LF realizado en conejo (1:500) (paneles c y e) y nuevamente se incubó como antes se mencionó. Después, se utilizó un anticuerpo anti-conejo realizado en oveja (1:1000) acoplado TRITC (paneles d y e). Nuevamente se lavaron las muestras y se sellaron con gelvatol para posteriormente analizarse y fotodocumentarse bajo microscopía de fluorescencia usando el software Leica Application Suite 3.6 en el microscopio LEICA DM1000 (Heilderberg, Alemania). Los paneles superiores corresponden a análisis en campo claro (a-e), mientras que las imágenes inferiores (f-j) corresponden a análisis con fluorescencia. Barra  $20 \mu\text{M}$ .

## **B. Lactoferrina bovina y los péptidos interaccionan con componentes de membrana de células Jurkat**

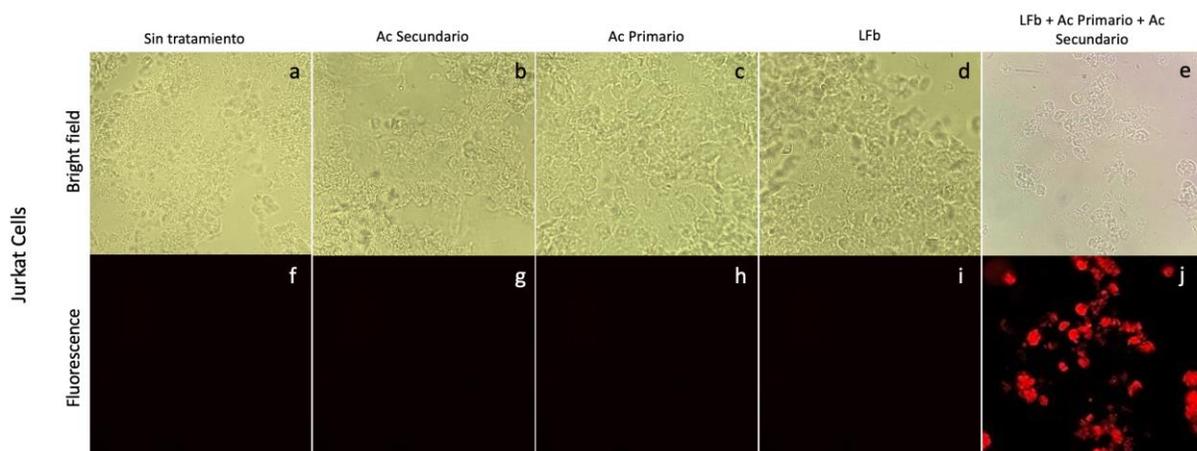
Posteriormente, se corroboró la interacción de la lactoferrina y los péptidos con las células Jurkat. Para ello primeramente se realizó un ensayo de fluorescencia directa utilizando los péptidos acoplados a fluorescencia (FITC, exhibe fluorescencia en color verde) (Figura 5), en cultivos de células Jurkat con las condiciones indicadas en materiales y métodos.

Como se puede apreciar en la Figura 5, LFcina 17-30-FITC (Panel f), LFampina 265-284-FITC (Panel g) y LF quimera-FITC (h), interaccionan con la membrana de las células Jurkat, ya que exhiben el color verde característico una vez que se observaron al microscopio de fluorescencia, teniendo como referencia las células observadas en microscopia de luz (Paneles b, c y d), mientras que los controles: el panel a, muestra el cultivo de células Jurkat sin tratamiento con péptidos, y el panel e muestra la fluorescencia basal de las células Jurkat (sin color verde). Esto nos permite concluir que los péptidos derivados de la bLF interactúan con componentes de membrana presentes en la línea celular Jurkat.

Por otro lado, en el caso de la bLF (Figura 6) se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, donde la lactoferrina fue detectada en las células Jurkat por el anticuerpo anti-LF y se inmuno-detectó utilizando un anticuerpo secundario acoplado a Tetra-Metil-Rodamina (TRITC), el cual fluoresce en color rojo (Panel j), mientras que el control de células en campo claro se visualiza en el panel e. En el caso de los otros paneles corresponde a los controles. Estos hallazgos nos indican que tanto la LF como los péptidos interaccionan con componentes de células Jurkat.



**Figura 5. Lactoferricina 17-30-FITC, Lactoferrampina 265-284-FITC y Lactoferrina quimera-FITC interaccionan con células Jurkat.** Cultivos de células Jurkat ( $1 \times 10^6$ ) se colocaron en pozos de cámaras de cultivo en medio RPMI. Posteriormente, las células se incubaron con *p*-formaldehído al 4% durante 30 min a 37°C y 5 atm de CO<sub>2</sub>. Después, las células se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron nuevamente en medio de cultivo (a) conteniendo 1 µM de LFcina 17-30-FITC (b), LFampina 265-284-FITC (c), y LF quimera-FITC (d), durante 1 h a 37°C y 5 atm de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, las células se lavaron nuevamente como antes se mencionó. Las muestras se lavaron y se sellaron con gelvatol para posteriormente analizarse y fotodocumentarse bajo microscopía de fluorescencia usando el software Leica Application Suite 3.6 en el microscopio LEICA DM1000 (Heilderberg, Alemania). Los paneles superiores (a-d) corresponden a análisis en campo claro, mientras que las imágenes inferiores (e-h) corresponden a análisis con fluorescencia. Barra 20 µM.



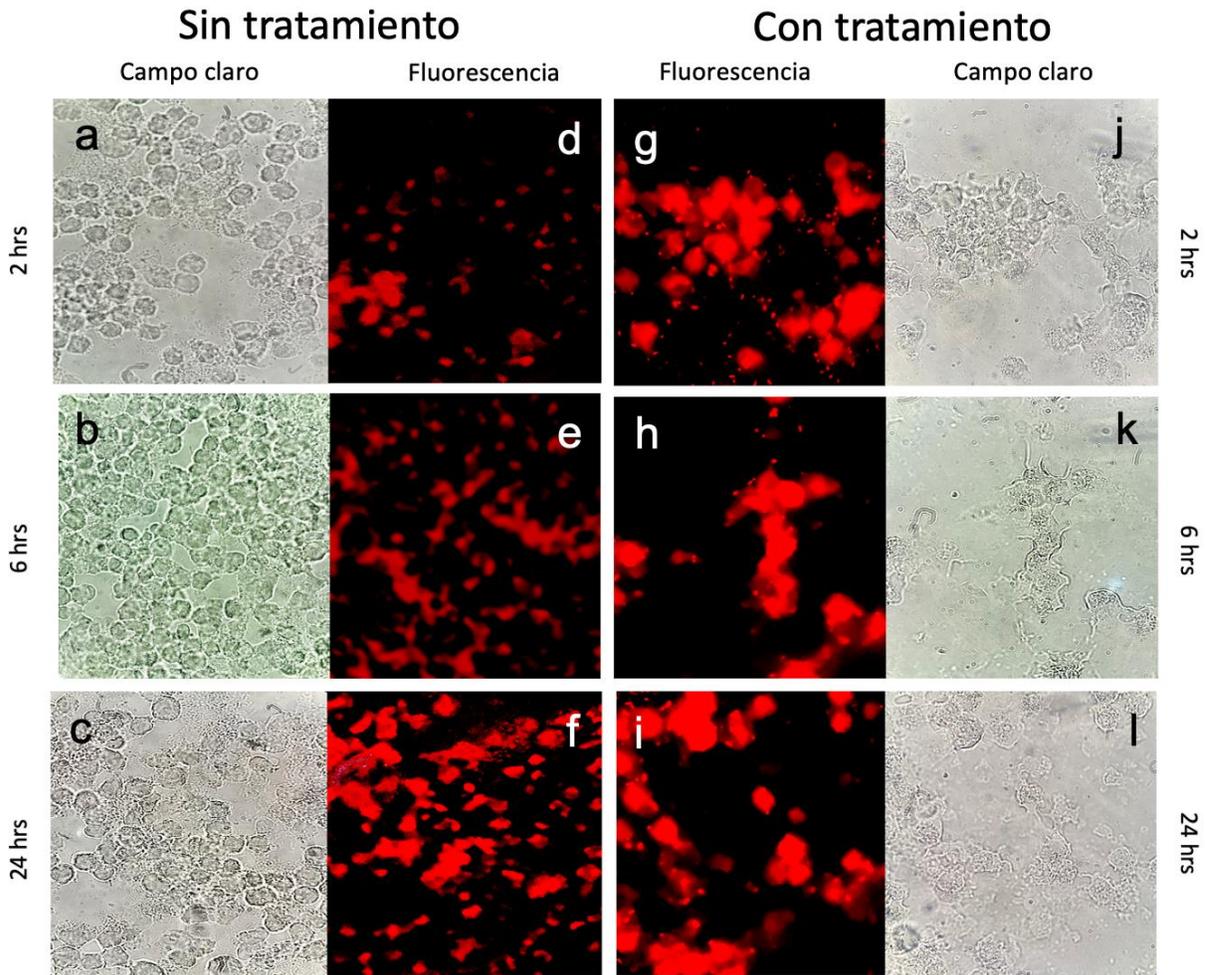
Abreviaturas: Ac, anticuerpos; LFb, Lactoferrina bovina.

**Figura 6. Lactoferrina interacciona con células Jurkat.** Cultivos de células Jurkat ( $1 \times 10^6$ ) se colocaron en pozos de cámaras de cultivo de ocho pozos en medio RPMI. Posteriormente, las células se incubaron con p-formaldehído al 4% durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  y 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Después, las células se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron nuevamente en medio de cultivo (a) conteniendo  $1 \mu\text{M}$  de Lactoferrina durante 1 h (b-f), a  $37^\circ\text{C}$  y 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Después de este tiempo, las células se lavaron nuevamente como antes y se agregó un anticuerpo anti-LF realizado en conejo (1:500) (paneles c, e, h, j) y nuevamente se incubó como antes se mencionó. Después, se utilizó un anticuerpo anti-conejo realizado en oveja (1:1000) acoplado TRITC (paneles b, e, g, j). Nuevamente se lavaron las muestras y se sellaron con gelvatol para posteriormente analizarse y fotodocumentarse bajo microscopía de fluorescencia usando el software Leica Application Suite 3.6 en el microscopio LEICA DM1000 (Heilderberg, Alemania). Los paneles superiores corresponden a análisis en campo claro (a-e), mientras que las imágenes inferiores (f-j) corresponden a análisis con fluorescencia. Barra  $20 \mu\text{M}$ .

### **C. Lactoferrina bovina activa la fagocitosis de *Escherichia coli* HB101 acoplada a TRITC en las células RAW 264.7.**

Una vez establecida la interacción entre las líneas celulares de RAW 264.7 y Jurkat, el siguiente paso fue corroborar la participación de bLF en la estimulación o activación de la fagocitosis de *E. coli* por las células RAW 264.7. Previo al reto con la bacteria, los cultivos de células RAW se trataron con bLF. Posteriormente, el reto o infección se realizó a través de la adición de UFC de *E. coli* HB 101 en células RAW 264.7. Se consideró ideal elegir específicamente la línea celular de RAW 264.7 por ser macrófagos aislados de leucemia linfocítica aguda inducida en ratones, lo que las convierte en el mejor modelo de estudio.

En los resultados se aprecia en la Figura 7, que el tiempo de incubación de 2 h en aquellas células pre-tratadas y posteriormente infectadas con *E. coli* HB 101 se observa mayor fagocitosis (Figura 3 panel g: 2 h, panel h: 6, y panel i: 24 h), indicado por el aumento de la intensidad de fluorescencia debida a TRITC en color rojo, a diferencia de los controles sin tratamiento previo con bLF (panel d), cuya actividad fagocítica (relacionada a la intensidad de fluorescencia por bacterias fagocitadas) por parte de las células aumenta, sólo a medida que aumente el tiempo de interacción con *E. coli* HB101 (panel d-f, aumento en la intensidad de fluorescencia del color rojo, se observa mayor IF a las 24 h). Estos resultados nos sugieren que bLF activa a los macrófagos RAW, ya que en las células no tratadas no se observó el mismo comportamiento.



**Figura 7. Lactoferrina bovina activa la fagocitosis de *Escherichia coli* HB101-TRITC en macrófagos RAW 264.7.** Cultivos de células RAW ( $1 \times 10^6$ ) se depositaron en cámaras de cultivo de 8 pozos en medio RPMI. Una vez establecidos, se añadió medio nuevo (paneles a, b y c) y en algunos casos se adicionó LF (paneles d, e y f). Después de esto, la cámara de cultivo se incubó nuevamente durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  y 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, las muestras se incubaron con  $1 \times 10^4$  UFC/ml de *Escherichia coli*, previamente teñida con TRITC, durante 2 h (a y d), 6 h (b y e) y 24 h (c y f). Las muestras se fijaron y procesaron en gelvatol, y se analizaron mediante microscopia de Luz y de fluorescencia, en un microscopio LEICA DM 1000.

#### **D. Lactoferrina modula la liberación de citocinas en células Jurkat**

Una vez demostrado que lactoferrina y los péptidos interaccionaban con las células RAW y Jurkat, y que LF estimula la fagocitosis de bacterias en macrófagos RAW, lo siguiente consistió en establecer si tenía algún efecto en la producción de citocinas por parte de las células Jurkat, ante un estímulo por infección o reto con la bacteria *Escherichia coli*.

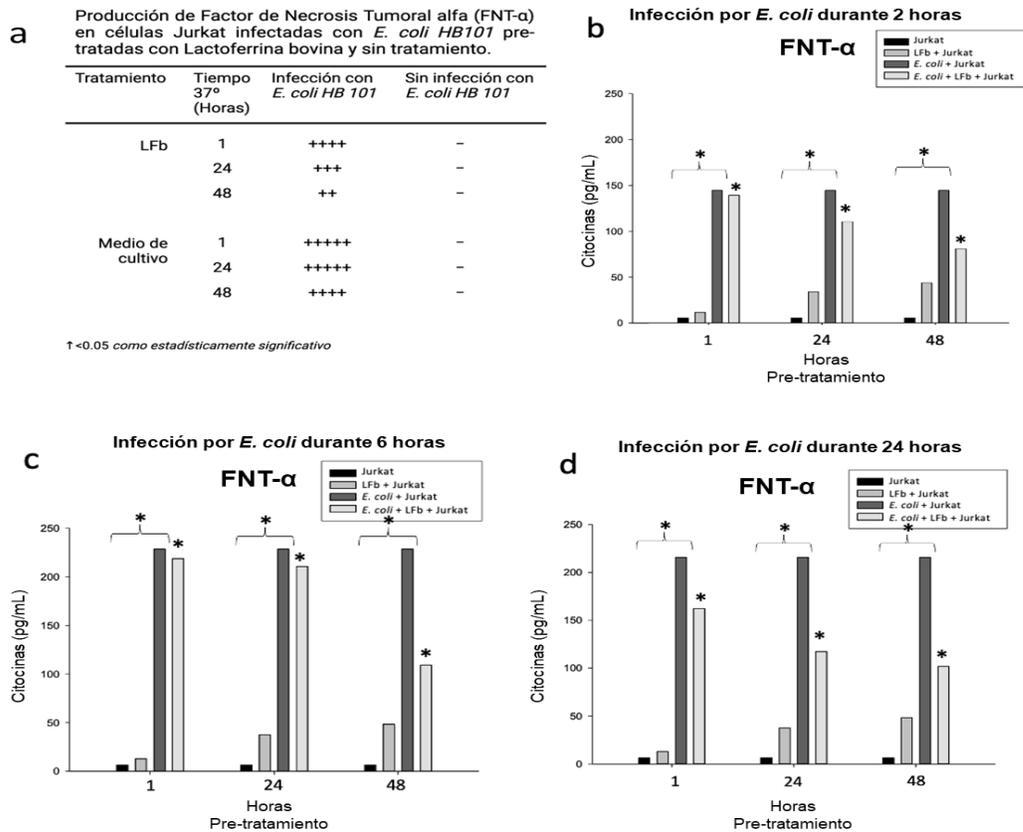
Para ello, se realizaron ensayos mediante la técnica de ELISA para la determinación de la concentración de citocinas en cultivos de células Jurkat. Tras estandarizar el ensayo de fagocitosis mencionados anteriormente, se determinó la concentración de las citocinas pro y anti-inflamatorias producidas por los cultivos bajo diferentes tratamientos, para imitar *in vitro* procesos infecciosos que pueden extrapolarse a procesos *in vivo*. Por tanto, se determinó la concentración de las citocinas pro-inflamatorias: FNT- $\alpha$  (Figura 8), IL-6 (Figura 9), y la IL-12 (Figura 10); y la citocina anti-inflamatoria: IL-4 (Figura 11), liberadas por los cultivos en las diferentes condiciones.

En las siguientes figuras, se observa la producción de citocinas cuantificadas mediante ensayo comercial de ELISA, donde los resultados corresponden a lo siguiente: la liberación de citocinas en sobrenadantes de cultivo de células Jurkat (liberación basal), pretratadas con BLF, incubadas solamente con *Escherichia coli*, y finalmente sobrenadantes de cultivos pretratados con bLF, y añadido *Escherichia coli*. Todas estas determinaciones se realizaron después de 1 (panel b, 24 panel c y 48 h panel d (Figuras 8-11). En estas Figuras el panel a se puede apreciar el resumen de la citocina.

En la Figura 8, que corresponde a FNT- $\alpha$  en las diferentes condiciones, lo que se encontró fue lo siguiente. En los resultados se puede apreciar el valor de FNT- $\alpha$  en el cultivo, lo que consideraríamos como concentración basal, se ve aproximadamente un valor similar en los diferentes tiempos de tratamiento, no hubo variación. Lo que corresponde al tratamiento de las células Jurkat con bLF, este es un poco más alto con respecto a la concentración basal, pero no hay variación con respecto al tiempo. En el caso de cultivos incubados con la bacteria, la liberación de la citocina incremento

considerablemente, no obstante; en las células pretratadas con bLF e incubadas con las bacterias, se puede apreciar que el hecho de que se haya preincubado el cultivo con esta proteína tiende a disminuir la liberación de esta.

En el caso de la IL-6 (Figura 9), es un comportamiento similar, la concentración de esta aumenta una vez que a los cultivos se les añade la bacteria, sin embargo, tiende a disminuir en aquellos cultivos que se les trató con bLF. Para el caso de la IL-12 (Figura 10), de igual manera lo relevante es el aumento de la concentración de esta citocina, y la modulación o disminución de esta liberación de IL-12 cuando las células Jurkat se pretrataron con bLF.



**Figura 8. Lactoferrina promueve la secreción de Factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) en células Jurkat incubadas con *Escherichia coli* HB101.** Cultivos de células Jurkat ( $1 \times 10^6$ ), se depositaron en cámaras de cultivo con RPMI. Posteriormente, en series de experimentos a las células se les pretrató con LFb a una concentración de  $1 \mu\text{M}$  durante 1, 24 y 48 h y se incubaron en las condiciones adecuadas antes mencionadas. Posteriormente, las células se incubaron con *Escherichia coli* durante 2 (panel b), 6 (panel c) y 24 (panel d) h, a 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Las células Jurkat en medio de cultivo indican la liberación basal de FNT- $\alpha$  y las células con LF la liberación de esta interleucina en presencia de bLF (pero sin reto con la bacteria), mientras que las células incubadas con *E. coli* es la liberación de FNT- $\alpha$  (pero sin la actividad inmunomoduladora de LFb). Al terminar cada uno de los tiempos, los sobrenadantes se recuperaron y congelaron, para posteriormente determinar la concentración de FNT- $\alpha$  por la técnica de ELISA como se indicó en la sección de materiales y métodos. Los experimentos se realizaron 2 veces por duplicado y se muestra la media y desviación estándar, así como la significancia estadística. En el panel a se puede resumir el comportamiento del FNT- $\alpha$  en cada una de las condiciones. ANOVA de medidas repetitivas unidireccionales; Todos los procedimientos de comparación múltiple por pares (prueba de Tukey).\*  $\uparrow$

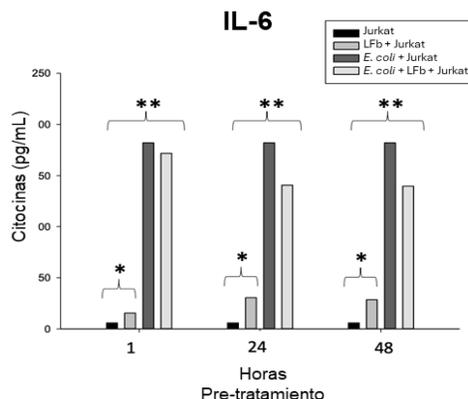
<0,05 como estadísticamente significativo \*\* ó >+ <0,01 como estadísticamente significativo

**a** Producción de Interleucina 6 (IL-6) en células Jurkat infectadas con *E. coli* HB101 pre-tratadas con Lactoferrina bovina y sin tratamiento.

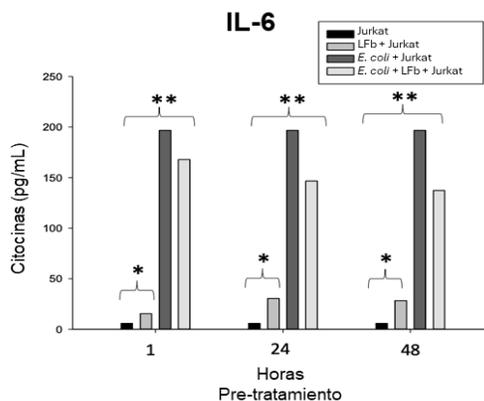
Tratamiento	Tiempo 37° (Horas)	Infección con <i>E. coli</i> HB 101	Sin infección con <i>E. coli</i> HB 101
LFb	1	++++	+
	24	++	+
	48	++	+
Medio de cultivo	1	+++++	-
	24	+++++	-
	48	+++++	-

† <0.05 como estadísticamente significativo

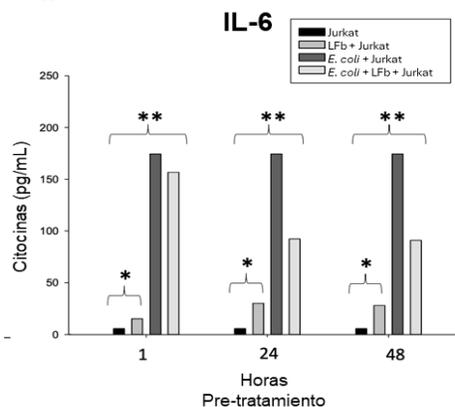
**b** Infección por *E. coli* durante 2 horas



**c** Infección por *E. coli* durante 6 horas



**d** Infección por *E. coli* durante 24 horas



### Figura 9. Liberación de IL-6 en células Jurkat pretratadas con Lactoferrina bovina

en presencia de *Escherichia coli* HB101. Cultivos de células Jurkat ( $1 \times 10^6$ ), se depositaron

en cámaras de cultivo con RPMI. Posteriormente, en series de experimentos a las células se les pretrató

con bLF a una concentración de  $1 \mu\text{M}$  durante 1, 24 y 48 h y se incubaron en las condiciones adecuadas

antes mencionadas. Posteriormente, las células se incubaron con *Escherichia coli* durante 2 (panel b), 6

(panel c) y 24 (panel d) h, a 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Las células Jurkat en medio de cultivo indican la liberación

basal de IL-6 y las células con LF la liberación de esta interleucina en presencia de bLF (pero sin reto

con la bacteria), mientras que las células incubadas con *E. coli* es la liberación de IL-6 (pero sin la

actividad inmunomoduladora de bLF). Al terminar cada uno de los tiempos, los sobrenadantes se

recupieron y congelaron, para posteriormente determinar la concentración de IL-6. En el panel a se

incluye un resumen con los datos más representativos. Los experimentos se realizaron por duplicado.

ANOVA de medidas repetitivas unidireccionales; Todos los procedimientos de comparación múltiple por

pares (prueba de Tukey).\* ó + <0,05 como estadísticamente significativo.\*\* ó >+ <0,01 como

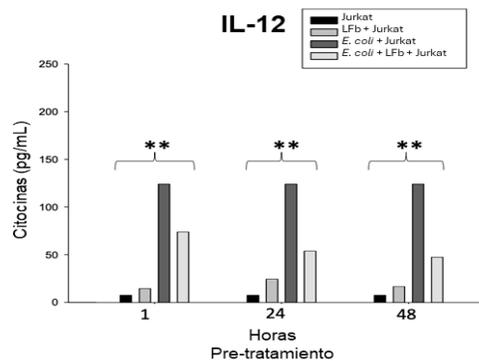
estadísticamente significativo.

**a** Producción de Interleucina 12 (IL-12) en células Jurkat infectadas con *E. coli* HB101 pre-tratadas con Lactoferrina bovina y sin tratamiento.

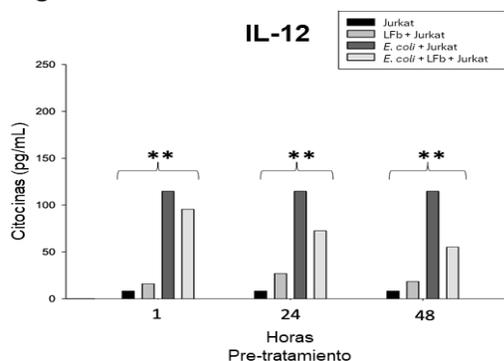
Tratamiento	Tiempo 37° (Horas)	Infección con <i>E. coli</i> HB 101	Sin infección con <i>E. coli</i> HB 101
LFb	1	++++	-
	24	+++	-
	48	++	-
Medio de cultivo	1	++++	-
	24	++++	-
	48	++++	-

† <0.05 como estadísticamente significativo

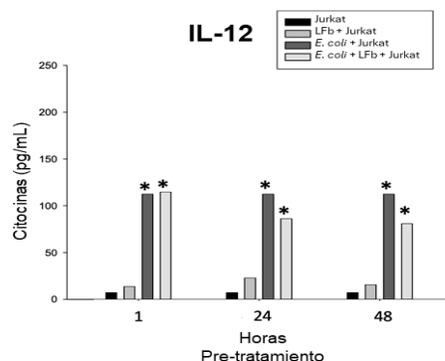
**b** Infección por *E. coli* durante 2 horas



**c** Infección por *E. coli* durante 6 horas



**d** Infección por *E. coli* durante 24 horas



**Figura 10. Producción de IL-12 en células Jurkat pretratadas con Lactoferrina bovina ante la presencia de Escherichia coli HB101.** Cultivos de células Jurkat ( $1 \times 10^6$ ),

se depositaron en cámaras de cultivo con RPMI. Posteriormente, en series de experimentos a las células se les pretrató con LFb a una concentración de  $1 \mu\text{M}$  durante 1, 24 y 48 h y se incubaron en las condiciones adecuadas antes mencionadas. Posteriormente, las células se incubaron con Escherichia coli durante 2 (panel a), 6 (panel b) y 24 (panel c) h, a 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Las células Jurkat en medio de cultivo indican la liberación basal de FNT- $\alpha$  y las células con LF la liberación de esta interleucina en presencia de bLF (pero sin reto con la bacteria), mientras que las células incubadas con *E. coli* es la liberación de IL-12 (pero sin la actividad inmunomoduladora de LFb). Al terminar cada uno de los tiempos, los sobrenadantes se recuperaron y congelaron, para posteriormente determinar la concentración de IL-12 por la técnica de ELISA como se indicó en la sección de materiales y métodos. Los experimentos se realizaron 2 veces por duplicado y se muestra la media y desviación estándar, así como la significancia estadística. ANOVA de medidas repetitivas unidireccionales; Todos los procedimientos de comparación múltiple por pares (método de Holm-Sidak) y todos los procedimientos de comparación múltiple por pares (prueba de Tukey). \* ó + <0,05 como estadísticamente significativo\*\* ó >+ <0,01 como estadísticamente significativo

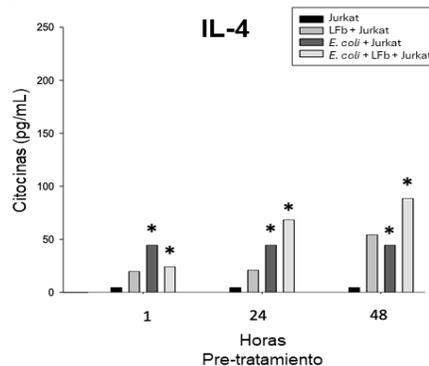
En la Figura 10 se observa la concentración detectada de interleucina 12 determinada mediante el ensayo de ELISA durante la infección con *E. coli* HB101, observándose una reducción significativa en todos los tiempos de pre-tratamiento con bLF, así como todos los tiempos de infección. Sin embargo, el resultado más destacado se mostró en el tratamiento de las células con infección con *E. coli* HB101 durante 2 y 6 h, mostrando la mayor concentración de interleucina 12 por parte *E. coli* HB101 en células no tratadas, mientras que las células pre-tratadas durante 48 h fueron las que mostraron menor concentración de interleucina 12 en comparación con las células no tratadas, en todos los tiempos de infección con *E. coli* HB101 (2, 6 y 24 h). Para el caso de la IL-4 (Figura 11), esta citocina anti-inflamatoria mantiene una concentración basal constante, que aumenta al añadir la bacteria, pero que se incrementa cuando los cultivos se trataron previamente con bLF. En la Figura 12, se puede apreciar un resumen sobre la modulación de las citosinas por parte de bLF.

**a** Producción de Interleucina 4 (IL-4) en células Jurkat infectadas con *E. coli* HB101 pre-tratadas con Lactoferrina bovina y sin tratamiento.

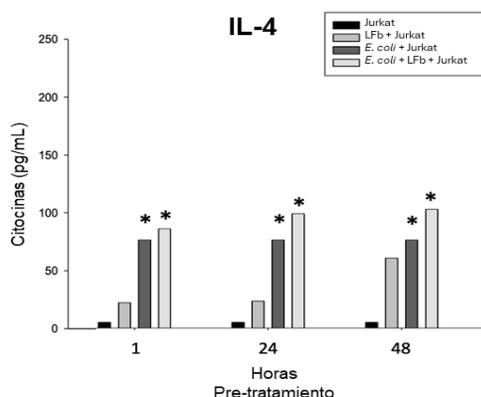
Tratamiento	Tiempo 37° (Horas)	Infección con <i>E. coli</i> HB 101	Sin infección con <i>E. coli</i> HB 101
LFb	1	+	-
	24	+++	-
	48	+++++	-
Medio de cultivo	1	++	-
	24	++	-
	48	+	-

† <0.05 como estadísticamente significativo

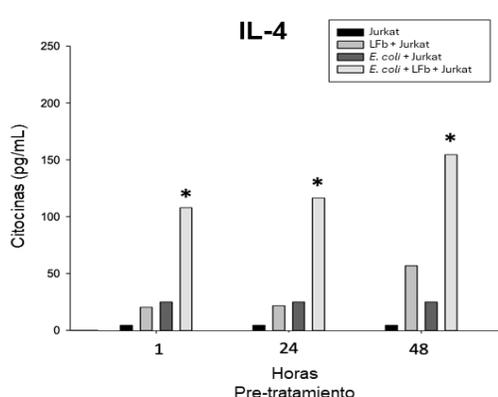
**b** Infección por *E. coli* durante 2 horas



**c** Infección por *E. coli* durante 6 horas



Infección por *E. coli* durante 24 horas



**Figura 11. Concentración de IL-4 en presencia de *Escherichia coli* HB101 y lactoferrina bovina.** Cultivos de células Jurkat ( $1 \times 10^6$ ), se depositaron en cámaras de cultivo con RPMI. Posteriormente, en series de experimentos a las células se les pre-trató con LFb a una concentración de  $1 \mu\text{M}$  durante 1, 24 y 48 h y se incubaron en las condiciones adecuadas antes mencionadas. Posteriormente, las células se incubaron con *Escherichia coli* HB 101 durante 2 (panel a), 6 (panel b) y 24 (panel c) h; a 5 atm de  $\text{CO}_2$ . Las células Jurkat en medio de cultivo indican la liberación basal de FNT- $\alpha$  y las células con LF la liberación de esta interleucina en presencia de LFB (pero sin reto con la bacteria), mientras que las células incubadas con *E. coli* es la liberación de FNT- $\alpha$  (pero sin la actividad inmunomoduladora de LFb). Al terminar cada uno de los tiempos, los sobrenadantes se recuperaron y congelaron, para posteriormente determinar la concentración de FNT- $\alpha$  por la técnica de ELISA como se indicó en la sección de materiales y métodos. Los experimentos se realizaron 2 veces por duplicado y se muestra la media y desviación estándar, así como la significancia estadística. ANOVA de medidas repetitivas unidireccionales; Todos los procedimientos de comparación múltiple por pares (prueba de Tukey). \* ó † <0,05 como estadísticamente significativo \*\* ó >++ <0,01 como estadísticamente significativa.

**Comparación de producción de citocinas en células Jurkat infectadas con E. coli HB101 pre-tratadas con lactoferrina bovina y sin tratamiento.**

Citocina	Tratamiento	Tiempo 37° (Horas)	Infección con E. coli HB 101	Sin infección con E. coli HB 101
FNT-α	LFb	1	++++	-
		24	+++	-
		48	++	-
	Medio de cultivo	1	+++++	-
		24	+++++	-
		48	++++	-
IL-4	LFb	1	+	-
		24	+++	-
		48	+++++	-
	Medio de cultivo	1	++	-
		24	++	-
		48	+	-
IL-6	LFb	1	++++	+
		24	++	+
		48	++	+
	Medio de cultivo	1	+++++	-
		24	+++++	-
		48	+++++	-
IL-12	LFb	1	++++	-
		24	+++	-
		48	++	-
	Medio de cultivo	1	++++	-
		24	++++	-
		48	++++	-

**Figura 12.** Resumen de los datos más representativos sobre la inmunomodulación de citocinas en células pretratadas de LF.

## VIII. DISCUSIÓN

El cáncer ha significado desde el inicio de los tiempos en que los romanos y griegos lo definieron como “*karkinos*” y comenzaron a documentar con tanto detalle los tumores malignos que se asociaban específicamente a cada órgano. A pesar de ser un conjunto de enfermedades documentadas desde hace siglos, hasta el día de hoy, es uno de los más grandes retos cuando se trata de devolver la salud al paciente (Papavramidou, Papavramidis, & Demetriou, 2010).

Pareciera que se le ha asociado con una enfermedad moderna, sin embargo; con este panorama que nos brinda el punto de vista de la biología celular, el cuerpo y el cáncer son inherentes a sí mismos, y de la misma forma sostienen una relación simbiótica (Atun et al., 2020). Es por ello que se continúan los esfuerzos por entenderla y tratar, considerando la importancia que predomina en torno al tema, por su alta prevalencia. A febrero del 2022, la OMS atribuyó más de 10 millones de defunciones, casi 1 de cada 6 muertes registradas en el mundo. Tan sólo en el en el 2020, causó 1,4 millones de muertes, un 47% de ellas en personas de 69 años de edad o más jóvenes (INEGI, 2021). En México también representa una de las principales causas de muerte. En pacientes pediátricos, es la segunda causa de muerte tan sólo después de los accidentes. Considerando que es la segunda causa de muerte en pacientes pediátricos, comprendemos su importancia, y el foco de atención que merecen los tipos de cáncer más prevalentes en esta población: aquellos de tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados. La leucemia linfoide representa el 61% de los casos totales de estos tipos de cáncer en esta población (CENSIA, 2023; INEGI, 2021). Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a la investigación de la LF y sus peptidos derivados, donde se ha demostrado que estos tienen actividad microbicida de amplio espectro, que disgrega biofilms e inhibe la formación de ellos y que actúa en sinergismo para realizar estas actividades con antibióticos a los cuales los microbios se han hecho resistentes (Flores-Villasenor et al., 2010; Flores-Villasenor et al., 2012; Leon-Sicairos et al., 2009; León-Sicairos & Picos, 2010). Entre los microorganismos patógenos que hemos estudiado se incluyen aislados clínicos causantes de

infecciones nosocomiales tales de *Staphylococcus aureus* resistente a Metilcilina, *Streptococcus pneumoniae* MDR (Angulo-Zamudio et al., 2019; Flores-Villasenor et al., 2010), hongos causantes de mucormicosis, especies de *Candida albicans* y no *albicans* resistentes a los azoles, parásitos tales como *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* (Manuscritos en preparación) y hemos demostrado la inducción de apoptosis en células aisladas de lavados nazofaríngeos de niños con metapneumovirus y virus sincitial respiratorio (Datos sin publicar).

Por otro lado, hemos demostrado la actividad antitumoral y sinergismo de la lactoferrina y péptidos con algunos de los quimioterapéuticos en líneas celulares derivadas de cáncer endometrial, cervicouterino, hígado y leucemia (Arredondo-Beltran et al., 2023; Ramirez-Sanchez et al., 2021). El mecanismo tanto para la actividad antitumoral como para la actividad microbicida depende en gran medida de la capacidad de LF y los péptidos para poder interactuar con componentes de membrana (Cutone et al., 2020). En neonatos y pacientes con cáncer se pudo constatar que la concentración de LF es baja, y esta baja concentración se asocia a mayor riesgo para la adquisición de infecciones nosocomiales en este tipo de pacientes (Jesús J Martínez-García et al., 2020).

En este trabajo, partimos de la idea de que las diferentes actividades biológicas de la LF pueden ayudar al paciente bajo tratamientos con quimioterapéuticos, que también reciben antibioterapia como manejo profiláctico y que pueden estar en entornos hospitalarios. Sin embargo, como no se ha demostrado anteriormente, primero realizamos los experimentos in vitro. El objetivo fue demostrar que lactoferrina y péptidos de alguna manera modulan la respuesta inmune de leucocitos hacia patógenos. Por lo tanto, el primer ensayo consistió en determinar si la LF y los péptidos si se unen a las células Jurkat y RAW.

Se ha reportado la participación directa apoptótica sobre células de leucemia/linfoma (Jurkat, THP-1, Raji, K562, CCRF-CEM), así como la evaluación previa de los niveles de lactoferrina en sepsis, en donde se ha correlacionado un aumento de esta los primeros 15 días de evolución, estando fuertemente asociado a procesos de

inflamación (Arredondo-Beltrán et al., 2023; Leon-Sicairos et al., 2009; León-Sicairos & Picos, 2010; Ramírez-Sánchez et al., 2021)

En ambas líneas celulares (Jurkat y RAW) se observó una interacción positiva, sobre componentes de membrana, sin embargo, en otros experimentos también se ha observado la endocitosis de bLF sino también de sus péptidos derivados: lactoferricina, lactoferrampina y lactoferrina quimera. En la literatura se ha encontrado que lactoferrina no solo interactúa con diversas líneas celulares de manera directa, sino que participa directamente sobre receptores como los tipo Toll, e incluso no solo se endocita en la célula sino que también funciona como factor de transcripción interactuando directamente con el núcleo (Dhennin-Duthille et al., 2000; Drago-Serrano et al., 2008), y partiendo de estos hallazgos, nuestro siguiente objetivo ir más allá y probar el posible estímulo de la actividad fagocítica de bLF.

Lo que se observó en los experimentos es que ambas líneas celulares si fagocitaron una mayor cantidad de bacterias (acopladas a rodamina), ya que se observó mayor intensidad de fluorescencia en las células RAW pretratadas con LF desde las 2, 6 y 24 h, con respecto a las células sin tratar con bLF. Con respecto a sus funciones como estimulador de la fagocitosis no hay mucho documentado, por lo que se tuvo que estandarizar el ensayo por pasos. Lactoferrina bovina tiene una amplia gama de grupos de bacterias contra los cuales ejerce un efecto bactericida, por lo cual se tuvo que diseñar de tal manera que *E. coli* HB101 y lactoferrina bovina no interactuaran directamente. Se eligió utilizar *E. coli*, por ser uno de los principales agentes patógenos en colonizar pacientes oncológicos pediátricos. Al ser una bacteria comensal, se le denomina en caso-específicos como lo son la colonización por inmunocompromiso, como “bacteria oportunista”, como muchas otras que forman parte de la barrera cutánea y flora intestinal. Bacterias que en condiciones normales no representarían una amenaza pero que, en pacientes oncológicos, se pueden volver mortales (Drago-Serrano et al., 2008). Este es el motivo por el cual las infecciones concomitantes representan la principal causa de muerte en esta población. Es por ello la importancia de haber elegido este ensayo en particular, ya que en condiciones patológicas (específicamente en el paciente oncológico), se crea alrededor del tumor un

microambiente tumoral inmunosupresor (MTI), el cual realentiza las células sanas, y adapta los mecanismos de defensa del sistema inmune para crear evasión inmunitaria por parte de las células mutadas, logrando el agotamiento de células T y B, así como Natural Killers (Eryilmaz & Canpolat, 2017; Jiménez-Morales, Aranda-Uribe, Pérez-Amado, Ramírez-Bello, & Hidalgo-Miranda, 2021).

Dentro de los hallazgos del ensayo de fagocitosis se encontró una alta actividad fagocítica en células RAW 264.7 (mismas que se eligieron por ser directamente macrófagos aislados de leucemia linfocítica aguda) desde las primeras horas de interacción con *E. coli*, demostrando su potencial para impulsar a las células a actuar aún bajo condiciones que se alejan de la idoneidad. Optimizando células que en ausencia de Lactoferrina bovina actuarían de manera más lenta, considerando que, en procesos infecciosos en un paciente inmunosuprimido, el tratamiento o actividad oportuna son cruciales para la sobrevida y supervivencia. Con estos resultados se busca ahondar en los canales de señalización que activa o estimula bLF con el fin de comprender mejor su mecanismo de acción, o sus vías para activar células en un estado casi letárgico en medio de un microambiente tumoral inmunosupresor.

Asimismo, se consideró de gran importancia la alta citotoxicidad presentada por los pacientes pediátricos con leucemia, inducida por las terapias aún más novedosas, por tanto; se logró evaluar la concentración de citocinas en presencia de Lactoferrina bovina a distintos tiempos. Los resultados encontrados en el presente trabajo son consistentes con respecto a sus horas de pre-tratamiento, siendo ascendente el efecto para la estimulación de citocinas anti-inflamatorias y descendente el efecto para la inhibición de producción de citocinas anti-inflamatorias, significando así que en pacientes oncológicos tiene gran potencial como protector y preventivo para desarrollar inflamación sistémica y por ende daño a órgano diana por periodos prolongados de inflamación (Millan et al., 2018). Incluso tiene un gran potencial como preventivo a desarrollar efectos adversos a largo plazo como daños cardiacos o neurológicos permanentes.

Con esto se determina que Lactoferrina bovina no sólo interactúa con la célula de manera pasiva, sino que de manera activa interviene en la actividad de células

pertenecientes al sistema inmunológico y actividades de la primera línea de defensa, y es un potencial efector del mismo. Gracias a su versatilidad o efecto “moonlightning”, no sólo tiene potencial para actuar como un modulador de la respuesta inmune, sino que tiene potencial como bactericida y antifúngico, protegiendo a su vez de manera directa el organismo contra los principales agentes que amenazan y comprometen la salud del paciente oncológico en tratamiento, considerándose el principal reto del personal de la salud durante el proceso a erradicar las células tumorales malignas. Sin mencionar los efectos antioxidantes que posee, protegiendo no sólo de agentes patógenos o a las células del microambiente tumoral inmunosupresor, sino a su vez de los procesos necróticos producidos primordialmente por múltiples quimioterapéuticos que se utilizan actualmente como terapias de primera elección contra leucemia al día de hoy, bajo sus funciones antioxidantes. Es así como bLF tiene potencial como tratamiento adyuvante, teniendo la capacidad de ser parte importante de uno de los pilares de tratamiento para leucemia (Levay & Viljoen, 1995; Millan et al., 2018; Nakamura-Bencomo et al., 2021).

Es importante mencionar que el potencial de bLF como efector de la respuesta inmune no sólo se limita a leucemia, o cáncer en general. Al hablar de sistema inmune, estamos hablando de una red multidisciplinaria completa que se dedica a diagnosticar y tratar precisamente la amplia gama de enfermedades autoinmunes existentes. Las enfermedades del sistema inmune son extensas, con orígenes de compromiso que van desde las mutaciones oncológicas, las genéticas, virales, bacterianas o incluso aquellas desencadenadas por estilo de vida. Es por ello que las posibilidades cuando al sistema inmune respectan, parecen ser enormemente vastas. Sugiriendo que bLF no sólo está limitada a enfermedades oncológicas cuyos tratamientos atentan contra el sistema inmune, sino a todas aquellas enfermedades que lo comprometan, independientemente de su origen.

Los tratamientos que tenemos disponibles hasta el momento han avanzado bastante de acuerdo a su dirección en cuanto a detección de células o receptores más específicos se trata. Tomando en cuenta que el desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento del cáncer no se había ampliado mucho desde 1960, con la introducción

de la quimioterapia, que hasta el día de hoy sigue siendo uno de los pilares iniciales en el tratamiento contra el cáncer. Se considera una de las opciones de primera línea al momento de tratar leucemia. Su función se basa principalmente en la erradicación de células leucémicas. Sin embargo, este no distingue entre células sanas o enfermas. Dando como resultado una lista de longitud considerable al momento de enumerar la cantidad de efectos adversos que se producen con su administración, que van desde daño sobre órgano diana (tejido cardiaco, musculoesquelético, nervioso, hematopoyético y conectivo), de donde se desprenden las premisas iniciales: La búsqueda de mejores alternativas (Jiménez-Morales et al., 2021).

Con ello nacieron nuevas ramas de tratamiento para erradicar el cáncer con sus nuevas apariciones, tales como los son la radioterapia, la terapia alogénica con células hematopoyéticas progenitoras, y la inmunoterapia, siendo este último el más novedoso de la familia de fármacos que tenemos hoy en día al alcance para administrar terapias mejor dirigidas al momento de tratar las diversas y múltiples enfermedades oncológicas. Sin embargo, su alta especificidad a células mutadas no lo exime de producir efectos adversos graves, siendo la alta citotoxicidad producida por su mecanismo de acción uno de los principales recursos bajo los que compromete al sistema inmune del paciente (Inaba & Pui, 2019).

La supresión inmunológica ha mostrado ser una pieza clave en el mantenimiento vital del paciente durante la administración de su modalidad de terapia administrada. Se ha comprendido que las leucemias, como parte de la familia oncológica a la que pertenece, es una enfermedad bastante compleja, y como tal se ha buscado tratarla de una manera más optimizada, entendiendo que no sólo se administra un fármaco, o quimioterapia como el pilar único, sino un grupo de familias de fármacos que en conjunto atenderán las necesidades del paciente en sus diversas etapas a lo largo de su tratamiento, cuyos grupos van desde quimioterapéuticos, corticoesteroides, inmunoterapéuticos y el grupo que ha tomado más relevancia en los últimos años: los inmunomoduladores (sin mencionar aquellos que conforman las paredes del tratamiento, considerados apoyo para los efectos adversos menos graves como lo son los antiinflamatorios no esteroideos, o antieméticos) (Atun et al., 2020).

Con este último salto dentro de las opciones terapéuticos, se abrió una pauta para considerar tratamientos adyuvantes de que apoyaran la vulnerabilidad inmunológica presentada por los pacientes pediátricos durante su tratamiento, considerando que muchos de estos pacientes aún no cuentan siquiera con un sistema inmune maduro, añadimos a la fórmula la administración de fármacos que no sólo suprime el sistema inmune sino que desencadenan incluso reacciones exageradas orgánicas, inflamación sistémica (gracias a la sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias) o incluso aplasia de líneas celulares enteras (provocada por la muerte celular generalizada, teniendo como una de las principales complicaciones el síndrome de lisis tumoral y neutropenia febril). Líneas que en condiciones normales nos ayudarían a combatir los diversos agentes patógenos que amenazan día con día la salud del paciente mismo. Así surge el hueco a rellenar por parte de los pilares que conforman el tratamiento para el cáncer de manera completa.

Una de las propuestas más llamativas hasta el momento es Lactoferrina bovina. Al ser una glicoproteína natural perteneciente a la familia de las transferrinas, y a la que se le han conferido múltiples funciones gracias a su gran versatilidad. Entre ellas se encuentran sus propiedades bactericidas, antifúngicas, antineoplásicas, antioxidantes, su participación en diversas vías metabólicas y más importante para fines de este estudio: sus propiedades inmunoregulatoras. Se le puede encontrar en secreciones mucosas como lágrimas, saliva, secreción nasal, bilis, jugo pancreático y gastrointestinal, así como fluido seminal y vaginal, y en calostro, leche, y gránulos de neutrófilos (J. Brock, 1980; J. H. Brock, 2002)

## IX. CONCLUSIONES

- Lactoferrina bovina y sus péptidos interaccionan con las líneas celulares Jurkat y RAW 264.7
- Lactoferrina bovina aumenta la actividad de fagocitosis en células RAW 264.7, siendo perceptible su efecto a partir de las primeras horas de infección con *E. coli* HB101, a diferencia de aquellas células que no fueron tratadas con Lactoferrina bovina.
- Lactoferrina bovina mostró una regulación de citocina pro y anti-inflamatorias de manera directa sobre células Jurkat al momento de infección con *E. coli* HB101. En el caso de las citocinas pro-inflamatorias que se producían al momento de la infección, Lactoferrina bovina disminuía su producción a mayores horas de pre-tratamiento, en cualquier tiempo de interacción con *E. coli* HB101.
- En el caso de la citocina anti-inflamatoria, Lactoferrina bovina demostró estimular la producción de la misma, mostrando mayor efecto de manera consistente (a mayor tiempo de pre-tratamiento con Lactoferrina bovina).

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Alsuwaigh, R., Lee, J., Chan, G., Chee, C. E., & Choo, S. P. (2019). Response to targeted therapy or chemotherapy following immunotherapy in patients with gastrointestinal cancers - a case series. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 162. doi:10.1186/s40425-019-0637-6
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M., & Baker, E. N. (1987). Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(7), 1769-1773. doi:10.1073/pnas.84.7.1769
- Angulo-Zamudio, U. A., Vidal, J. E., Nazmi, K., Bolscher, J. G. M., Leon-Sicairos, C., Antezana, B. S., . . . Leon-Sicairos, N. (2019). Lactoferrin Disaggregates Pneumococcal Biofilms and Inhibits Acquisition of Resistance Through Its DNase Activity. *Front Microbiol*, 10, 2386. doi:10.3389/fmicb.2019.02386
- Arredondo-Beltran, I. G., Ramirez-Sanchez, D. A., Zazueta-Garcia, J. R., Canizalez-Roman, A., Angulo-Zamudio, U. A., Velazquez-Roman, J. A., . . . Leon-Sicairos, N. (2023). Antitumor activity of bovine lactoferrin and its derived peptides against HepG2 liver cancer cells and Jurkat leukemia cells. *Biometals*. doi:10.1007/s10534-022-00484-4
- Arredondo-Beltrán, I. G., Ramírez-Sánchez, D. A., Zazueta-García, J. R., Canizalez-Roman, A., Angulo-Zamudio, U. A., Velazquez-Roman, J. A., . . . León-Sicairos, N. (2023). Antitumor activity of bovine lactoferrin and its derived peptides against HepG2 liver cancer cells and Jurkat leukemia cells. *Biometals*, 36(3), 639-655. doi:10.1007/s10534-022-00484-4
- Atun, R., Bhakta, N., Denburg, A., Frazier, A. L., Friedrich, P., Gupta, S., . . . Allemani, C. (2020). Sustainable care for children with cancer: a Lancet Oncology Commission. *The Lancet Oncology*, 21(4), e185-e224.
- Baker, E., & Baker, H. (2005). Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2531-2539.

- Baker, E. N., Anderson, B. F., Baker, H. M., Day, C. L., Haridas, M., Norris, G. E., . . . Thomas, D. H. (1994). Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states. In *Lactoferrin* (pp. 1-12): Springer.
- Baker, E. N., Anderson, B. F., Baker, H. M., Haridas, M., Jameson, G. B., Norris, G. E., . . . Smith, C. A. (1991). Structure, function and flexibility of human lactoferrin. *International journal of biological macromolecules*, 13(3), 122-129.
- Baveye, S., Ellass, E., Mazurier, J., Spik, G., & Legrand, D. (1999). Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process.
- Bhakta, N., Force, L. M., Allemani, C., Atun, R., Bray, F., Coleman, M. P., . . . Rodriguez-Galindo, C. (2019). Childhood cancer burden: a review of global estimates. *The Lancet Oncology*, 20(1), e42-e53.
- Boffo, S., Damato, A., Alfano, L., & Giordano, A. (2018). CDK9 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 1-10.
- Brock, J. (1980). Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Archives of disease in childhood*, 55(6), 417.
- Brock, J. H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell biology*, 80(1), 1-6.
- Broxmeyer, H. E., Williams, D. E., Hangoc, G., Cooper, S., Gentile, P., Shen, R. N., . . . Bicknell, D. C. (1987). The opposing actions in vivo on murine myelopoiesis of purified preparations of lactoferrin and the colony stimulating factors. *Blood Cells*, 13(1-2), 31-48.
- Cameron, F., Whiteside, G., & Perry, C. (2011). Ipilimumab. *Drugs*, 71(8), 1093-1104.

- CENSIA. (2023). Cáncer infantil en niñas, niños y adolescentes. *Centro Nacional para la Salud de la Infancia y de la Adolescencia*, <https://www.gob.mx/salud/censia/es/articulos/cancer-infantil-en-ninas-ninos-y-adolescentes?idiom=es>.
- Cutone, A., Rosa, L., Ianiro, G., Lepanto, M. S., Bonaccorsi di Patti, M. C., Valenti, P., & Musci, G. (2020). Lactoferrin's Anti-Cancer Properties: Safety, Selectivity, and Wide Range of Action. *Biomolecules*, *10*(3). doi:10.3390/biom10030456
- de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, *8*(2), e180-e190.
- De Sousa, M., Breedvelt, F., Dynesius-Trentham, R., Trentham, D., & Lum, J. (1988). Iron, iron-binding proteins and immune system cells. *Ann N Y Acad Sci*.
- Dhennin-Duthille, I., Masson, M., Damiens, E., Fillebeen, C., Spik, G., & Mazurier, J. (2000). Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*, *79*(4), 583-593.
- Drago-Serrano, M. E., Flores-Romo, L., Oliver-Aguillón, G., Jarillo-Luna, R. A., Reina-Garfias, H., Barbosa-Cabrera, E., & Campos-Rodríguez, R. (2008). La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Bioquímica*, *33*(2), 71-82.
- Ebrahim, F., Shankaranarayanan, J. S., Kanwar, J. R., Gurudevan, S., Krishnan, U. M., & Kanwar, R. K. (2014). Identification of unprecedented anticancer properties of high molecular weight biomacromolecular complex containing bovine lactoferrin (HMW-bLf). *PloS one*, *9*(9), e106568.
- Eryilmaz, E., & Canpolat, C. (2017). Novel agents for the treatment of childhood leukemia: an update. *OncoTargets and therapy*, *10*, 3299.

- Fadel, S. A., Boschi-Pinto, C., Yu, S., Reynales-Shigematsu, L. M., Menon, G. R., Newcombe, L., . . . Jha, P. (2019). Trends in cause-specific mortality among children aged 5–14 years from 2005 to 2016 in India, China, Brazil, and Mexico: an analysis of nationally representative mortality studies. *The Lancet*, 393(10176), 1119-1127.
- Figuerola-Lozano, S., Valk-Weeber, R. L., Akkerman, R., Abdulahad, W., Van Leeuwen, S. S., Dijkhuizen, L., & De Vos, P. (2020). Inhibitory effects of dietary n-glycans from bovine lactoferrin on toll-like receptor 8; comparing efficacy with chloroquine. *Frontiers in immunology*, 11, 790.
- Flores-Villasenor, H., Canizalez-Roman, A., Reyes-Lopez, M., Nazmi, K., de la Garza, M., Zazueta-Beltran, J., . . . Bolscher, J. G. (2010). Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFc<sub>in</sub>, LFc<sub>ampin</sub> and LFc<sub>chimera</sub> on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals*, 23(3), 569-578. doi:10.1007/s10534-010-9306-4
- Flores-Villasenor, H., Canizalez-Roman, A., Velazquez-Roman, J., Nazmi, K., Bolscher, J. G., & Leon-Sicairos, N. (2012). Protective effects of lactoferrin chimera and bovine lactoferrin in a mouse model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Biochem Cell Biol*, 90(3), 405-411. doi:10.1139/o11-089
- Force, L. M., Abdollahpour, I., Advani, S. M., Agius, D., Ahmadian, E., Alahdab, F., . . . Allen, C. A. (2019). The global burden of childhood and adolescent cancer in 2017: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Oncology*, 20(9), 1211-1225.
- Fujita, K.-i., Matsuda, E., Sekine, K., Iigo, M., & Tsuda, H. (2004). Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis*, 25(10), 1961-1966. doi:10.1093/carcin/bgh205

- Fung, A., Horton, S., Zabih, V., Denburg, A., & Gupta, S. (2019). Cost and cost-effectiveness of childhood cancer treatment in low-income and middle-income countries: a systematic review. *BMJ global health*, 4(5), e001825.
- Gahr, M., Speer, C., Damerau, B., & Sawatzki, G. (1991). Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Leukoc Biol*, 49(5), 427-433.
- Gentile, P., & Broxmeyer, H. (1983). Suppression of mouse myelopoiesis by administration of human lactoferrin in vivo and the comparative action of human transferrin. *Blood*, 61(5), 982-993.
- Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L., & Antonini, G. (2016). Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals*, 9(4), 61.
- Gibson, T. M., Ehrhardt, M. J., & Ness, K. K. (2016). Obesity and metabolic syndrome among adult survivors of childhood leukemia. *Current treatment options in oncology*, 17(4), 1-13.
- Gómez Gallego, C., Pérez Conesa, D., Bernal Cava, M. J., Periago Castón, M. J., & Ros Berruezo, G. (2009). Compuestos funcionales de la leche materna. *Enfermería Global*, 0-0.
- Guillén, C., McInnes, I. B., Vaughan, D. M., Kommajosyula, S., Van Berkel, P. H. C., Leung, B. P., . . . Brock, J. H. (2002). Enhanced Th1 Response to Staphylococcus aureus Infection in Human Lactoferrin-Transgenic Mice. *The Journal of Immunology*, 168(8), 3950-3957.
- Gutteridge, J. M., Paterson, S. K., Segal, A. W., & Halliwell, B. (1981). Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochemical Journal*, 199(1), 259.
- Hadley, L. G., Rouma, B. S., & Saad-Eldin, Y. (2012). *Challenge of pediatric oncology in Africa*. Paper presented at the Seminars in pediatric surgery.

- Hu, L., Hu, X., Long, K., Gao, C., Dong, H.-L., Zhong, Q., . . . Gong, F.-Y. (2017). Extraordinarily potent proinflammatory properties of lactoferrin-containing immunocomplexes against human monocytes and macrophages. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Inaba, H., & Pui, C.-H. (2019). Immunotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(4), 595-610.
- INEGI. (2021). *Estadísticas a propósito del Día Mundial contra El Cáncer*. Online Retrieved from [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf)
- Jesús J Martínez-García, GámezEscarrega, C. J., Martínez-Félix, N. S., Canizalez-Román, A., AnguloZamudio, U. A., León-Sicairos, N. M., & Angulo-Zamudio, U. A. (2020). Plasma lactoferrin levels in newborn infants with early-onset neonatal sepsis. *Journal of Pediatrics and Neonatal Care*.
- Jiménez-Morales, S., Aranda-Uribe, I. S., Pérez-Amado, C. J., Ramírez-Bello, J., & Hidalgo-Miranda, A. (2021). Mechanisms of Immunosuppressive Tumor Evasion: Focus on Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in immunology*, 12. doi:10.3389/fimmu.2021.737340
- Kanwar, J. R., Mahidhara, G., & Kanwar, R. K. (2012). Novel alginate-enclosed chitosan–calcium phosphate-loaded iron-saturated bovine lactoferrin nanocarriers for oral delivery in colon cancer therapy. *Nanomedicine*, 7(10), 1521-1550.
- Kruzel, M. L., Zimecki, M., & Actor, J. K. (2017). Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology. *Frontiers in immunology*, 8, 1438.
- Kumar, V., & Abbas, A. K. (2021). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*: Elsevier Health Sciences.

- Lang, F., Wojcik, B., & Rieger, M. A. (2015). Stem cell hierarchy and clonal evolution in acute lymphoblastic leukemia. *Stem Cells International*, 2015.
- Lee, S.-H., Hwang, H.-M., Pyo, C.-W., Hahm, D. H., & Choi, S.-Y. (2010). E2F1-directed activation of Bcl-2 is correlated with lactoferrin-induced apoptosis in Jurkat leukemia T lymphocytes. *Biometals*, 23(3), 507-514.
- Legrand, D. (2016). Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *The Journal of pediatrics*, 173, S10-S15.
- Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M., & Mazurier, J. (2005). Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2549-2559. doi:10.1007/s00018-005-5370-2
- Leon-Sicairos, N., Canizalez-Roman, A., de la Garza, M., Reyes-Lopez, M., Zazueta-Beltran, J., Nazmi, K., . . . Bolscher, J. G. (2009). Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochimie*, 91(1), 133-140.
- León-Sicairos, N., & Picos, V. (2010). Lactoferrina: proteína que secuestra hierro en las mucosas. *La lucha por el hierro patógeno versus hospedero. 1ra Edición. México: Cinvestav*.
- Levay, P. F., & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80(3), 252-267.
- Lönnerdal, B., & Iyer, S. (1995). Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual review of nutrition*, 15(1), 93-110.
- Lozano, R., Wang, H., Foreman, K. J., Rajaratnam, J. K., Naghavi, M., Marcus, J. R., . . . Atkinson, C. (2011). Progress towards Millennium Development Goals 4 and 5 on maternal and child mortality: an updated systematic analysis. *The Lancet*, 378(9797), 1139-1165.

- Ma, J., Jemal, A., Fedewa, S. A., Islami, F., Lichtenfeld, J. L., Wender, R. C., . . . Brawley, O. W. (2019). The American Cancer Society 2035 challenge goal on cancer mortality reduction. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(5), 351-362.
- Machnicki, M., Zimecki, M., & Zagulski, T. (1993). Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int J Exp Pathol*, 74(5), 433-439.
- Magrath, I., Steliarova-Foucher, E., Epelman, S., Ribeiro, R. C., Harif, M., Li, C. K., . . . Howard, S. C. (2013). Paediatric cancer in low-income and middle-income countries. *Lancet Oncol*, 14(3), e104-116. doi:10.1016/s1470-2045(13)70008-1
- Martín, A. P., Escudero, J. B., Girón, S. H., & Gómez, A. P. (2021). Avances y perspectivas actuales en recursos y estrategias terapéuticas: fármacos biológicos. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(33), 1882-1892.
- Mathur, P., Sathishkumar, K., Chaturvedi, M., Das, P., Sudarshan, K. L., Santhappan, S., . . . Roselind, F. S. (2020). Cancer statistics, 2020: report from national cancer registry programme, India. *JCO Global Oncology*, 6, 1063-1075.
- Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, 9(4), 217.
- Millan, N. C., Pastrana, A., Gutter, M. R., Zubizarreta, P. A., Monges, M. S., & Felice, M. S. (2018). Acute and sub-acute neurological toxicity in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 65, 86-93. doi:10.1016/j.leukres.2017.12.010
- Moasser, M. M. (2015). Neoplasia. In G. D. Hammer & S. J. McPhee (Eds.), *Fisiopatología de la enfermedad*, 7e. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Mohan, P., & Abrams, S. A. (2009). Oral lactoferrin for the treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD007138. doi:10.1002/14651858.CD007138.pub2

- Moody, K., Meyer, M., Mancuso, C. A., Charlson, M., & Robbins, L. (2006). Exploring concerns of children with cancer. *Supportive care in cancer, 14*(9), 960-966.
- Moore, S. A., Anderson, B. F., Groom, C. R., Haridas, M., & Baker, E. N. (1997). Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of molecular biology, 274*(2), 222-236.
- Nakamura-Bencomo, S., Gutierrez, D. A., Robles-Escajeda, E., Iglesias-Figueroa, B., Siqueiros-Cendón, T. S., Espinoza-Sánchez, E. A., . . . Varela-Ramirez, A. (2021). Recombinant human lactoferrin carrying humanized glycosylation exhibits antileukemia selective cytotoxicity, microfilament disruption, cell cycle arrest, and apoptosis activities. *Investigational New Drugs, 39*(2), 400-415.
- Ngoma, T. (2006). World Health Organization cancer priorities in developing countries. *Annals of oncology, 17*, viii9-viii14.
- Ochoa, T. J., Pezo, A., Cruz, K., Chea-Woo, E., & Cleary, T. G. (2012). Clinical studies of lactoferrin in children. *Biochem Cell Biol, 90*(3), 457-467. doi:10.1139/o11-087
- Organization, W. H. (2019). *Global action plan on physical activity 2018-2030: more active people for a healthier world*: World Health Organization.
- Papavramidou, N., Papavramidis, T., & Demetriou, T. (2010). Ancient Greek and Greco–Roman methods in modern surgical treatment of cancer. *Annals of surgical oncology, 17*, 665-667.
- Pettitt, A. R., Jackson, R., Carruthers, S., Dodd, J., Dodd, S., Oates, M., . . . Dearden, C. E. (2012). Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *Journal of Clinical Oncology, 30*(14), 1647-1655.
- Puddu, P., Valenti, P., & Gessani, S. (2009). Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. *Biochimie, 91*(1), 11-18.

- Pui, C.-H. (2009). *Acute lymphoblastic leukemia: introduction*. Paper presented at the Seminars in hematology.
- Ramirez-Sanchez, D. A., Arredondo-Beltran, I. G., Canizalez-Roman, A., Flores-Villasenor, H., Nazmi, K., Bolscher, J. G. M., & Leon-Sicairos, N. (2021). Bovine lactoferrin and lactoferrin peptides affect endometrial and cervical cancer cell lines. *Biochem Cell Biol*, 99(1), 149-158. doi:10.1139/bcb-2020-0074
- Ramírez-Sánchez, D. A., Arredondo-Beltrán, I. G., Canizalez-Roman, A., Flores-Villaseñor, H., Nazmi, K., Bolscher, J. G. M., & León-Sicairos, N. (2021). Bovine lactoferrin and lactoferrin peptides affect endometrial and cervical cancer cell lines. *Biochem Cell Biol*, 99(1), 149-158. doi:10.1139/bcb-2020-0074
- Reyes, S. J., González, K. B., Rodríguez, C., Navarrete-Muñoz, C., Salazar, A. P., Villagra, A., . . . Hepp, M. I. (2020). Actualización general de inmunoterapia en cáncer. *Revista médica de Chile*, 148(7), 970-982.
- Rodriguez-Galindo, C., Friedrich, P., Alcasabas, P., Antillon, F., Banavali, S., Castillo, L., . . . Sullivan, M. J. (2015). Toward the cure of all children with cancer through collaborative efforts: pediatric oncology as a global challenge. *Journal of Clinical Oncology*, 33(27), 3065.
- Russell, M. W., Bobek, L. A., Brock, J. H., Hajishengallis, G., & Tenovuo, J. (2005). Innate Humoral Defense Factors. *Mucosal Immunology*, 73-93. doi:10.1016/B978-012491543-5/50009-7
- Sánchez, L., Calvo, M., & Brock, J. H. (1992). Biological role of lactoferrin. *Arch Dis Child*, 67(5), 657-661. doi:10.1136/adc.67.5.657
- Sawatzki, G., & Rich, I. N. (1989). *Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production in vitro and in vivo* (Vol. 15).
- Schmiegelow, K., Müller, K., Mogensen, S. S., Mogensen, P. R., Wolthers, B. O., Stoltze, U. K., . . . Frandsen, T. (2017). Non-infectious chemotherapy-associated

acute toxicities during childhood acute lymphoblastic leukemia therapy. *F1000Res*, 6, 444. doi:10.12688/f1000research.10768.1

Shau, H., Kim, A., & Golub, S. (1992). Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J Leukoc Biol*, 51(4), 343-349.

Sørensen, M., & Sørensen, S. P. L. (1939). *The Proteins in Whey*: Hagerup in Komm.

Suárez Casillas, P. (2020). Aplicaciones clínicas de los anticuerpos recombinantes.

Suchato, C. (2015). Abeloff's Clinical Oncology. *The Bangkok Medical Journal*, 10, 98-98.

Sun, X.-L., Baker, H. M., Shewry, S. C., Jameson, G. B., & Baker, E. N. (1999). Structure of recombinant human lactoferrin expressed in *Aspergillus awamori*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(2), 403-407.

Togawa, J.-I., Nagase, H., Tanaka, K., Inamori, M., Nakajima, A., Ueno, N., . . . Sekihara, H. (2002). Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17(12), 1291-1298. doi:10.1046/j.1440-1746.2002.02868.x

Tsuda, H., Kozu, T., Inuma, G., Ohashi, Y., Saito, Y., Saito, D., . . . Fukamachi, K. (2010). Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial. *Biometals*, 23(3), 399-409.

Valk-Weeber, R. L., Eshuis-de Ruiter, T., Dijkhuizen, L., & van Leeuwen, S. S. (2019). Dynamic temporal variations in bovine lactoferrin glycan structures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(2), 549-560.

Vogel, H. J. (2012). Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem Cell Biol*, 90(3), 233-244. doi:10.1139/o2012-016

- Ward, Z. J., Yeh, J. M., Bhakta, N., Frazier, A. L., & Atun, R. (2019). Estimating the total incidence of global childhood cancer: a simulation-based analysis. *The Lancet Oncology*, 20(4), 483-493.
- Weinberg, H. S., & Cook, S. J. (2002). Segmented flow injection, UV digestion, and amperometric detection for the determination of total cyanide in wastewater treatment plant effluents. *Analytical chemistry*, 74(23), 6055-6063.
- World Health, O. (2021). *CureAll framework: WHO global initiative for childhood cancer: increasing access, advancing quality, saving lives*. Geneva: World Health Organization.
- Yeoh, A., Collins, A., Fox, K., Shields, S., Ritchie, P., Kirby, M., & Revesz, T. (2017). Treatment delay and the risk of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, 34(1), 38-42. doi:10.1080/08880018.2016.1276235
- Zawitkowska, J., Lejman, M., Zaucha-Prażmo, A., Drabko, K., Płonowski, M., Balsa, J., . . . Kowalczyk, J. (2019). Grade 3 and 4 Toxicity Profiles During Therapy of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *In Vivo*, 33(4), 1333-1339. doi:10.21873/invivo.11608
- Zhang, Y., Lima, C. F., & Rodrigues, L. R. (2014). Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutr Rev*, 72(12), 763-773. doi:10.1111/nure.12155

## XI. ANEXOS



DFIE/22/E4/068EA/4/Cg&/M/61/241022-271022

**EL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, LA RED DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN, LA UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA Y LA SOCIEDAD ESTUDIANTIL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA**

Otorgan la presente constancia a:



**Daniela Bastidas, Amilkar I. Araujo Bedoya, Uriel A. Angulo Zamudio, Nidia León Sicairos.**

Por su participación como **PONENTE** con la presentación en CARTEL de su trabajo titulado:

**"Participation of the protein lactoferrin and its peptides in the growth and assimilation of glucose by *Candida albicans*."**

en el 3<sup>er</sup> Biotechnology World Symposium y 4<sup>o</sup> Congreso Estudiantil de Ingeniería Biotecnológica SEIBT.

**Dra. María Guadalupe Sotelo**  
Directora de UPIBI

**Dra. Norma Leyva**  
Coordinadora de la Red de Biotecnología

**Hannia Sinai Martínez Sánchez**  
Presidenta de la SEIBT

Mazatlán, Sinaloa, México del 24 al 27 de octubre de 2022



# SERVICIOS DE SALUD DE SINALOA

## Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sinaloa

Otorga la presente

### CONSTANCIA a

**BASTIDAS- DANIELA ALEJANDRA, Canizalez Román Adrián , León Sicairos Nidia M.**

*por el trabajo libre intitulado :*

**« Comparación de la respuesta inmune inducida por lactoferrina en células RAW  
264.7 y células Jurkat »**

presentado en cartel durante las

### Jornadas Académicas en Salud Pública 2023

en las instalaciones del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sinaloa.

Culiacán, Sinaloa del 05-08 de diciembre de 2023

  
MSP. OMAR LOMELI BARREDA  
DIRECTOR DEL LABORATORIO ESTATAL  
DE SALUD PUBLICA

  
SERVICIOS DE SALUD  
DE SINALOA  
LABORATORIO  
ESTATAL



SINALOA  
GOBIERNO DEL ESTADO



EL GOBIERNO DEL ESTADO DE SINALOA, A TRAVÉS DE LA COORDINACIÓN GENERAL PARA EL FOMENTO A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INNOVACIÓN DEL ESTADO DE SINALOA Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA MEDIANTE EL CENTRO DE POLÍTICAS DE GÉNERO PARA LA IGUALDAD ENTRE MUJERES Y HOMBRES

OTORGAN LA PRESENTE

## **CONSTANCIA**

A:

**DANIELA ALEJANDRA BASTIDAS**

POR SU PARTICIPACIÓN COMO  
EXPOSITORA DE CARTEL CIENTÍFICO  
EN EL



PRIMER CONGRESO DE  
**INVESTIGADORAS  
SINALOENSES**

CELEBRADO LOS DÍAS 14 Y 15 DE MARZO EN EL CENTRO DE APRENDIZAJE VIVENCIAL DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA

CULIACÁN ROSALES, SINALOA, MARZO DE 2024

**DR. CARLOS KARAM QUIÑONES**  
Director General de CONFÍE

**DRA. BEATRIZ EUGENIA RODRÍGUEZ PÉREZ**  
Directora General del CPGIMYH de la UAS



**XVI INTERNATIONAL CONFERENCE ON LACTOFERRIN**  
Structure, Function & Applications  
6-10 NOVEMBER 2023, ROME (ITALY)

**CERTIFICATE**

This is to certify that

**DANIELA ALEJANDRA BASTIDAS**

has been selected for the **GENEVIEVE SPIK AWARD**  
at the **XVI INTERNATIONAL CONFERENCE ON LACTOFERRIN**  
**Structure, Functions & Applications**  
6-10 November, 2023, Rome (ITALY)

*Prof. Bo Lönnerdal*  
President  
International Scientific Committee on Lactoferrin

*Prof. Piera Valenti*  
Chair  
XVI International Conference on Lactoferrin

