

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

**Purificación de lactoferrinas bovina y porcina y
evaluación de su actividad antibacteriana sobre
Escherichia coli K88**

POR

DORA ALICIA RODRÍGUEZ FRANCO

TESIS AFINADA PARA LA
OBTENCIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

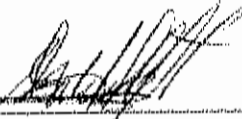
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

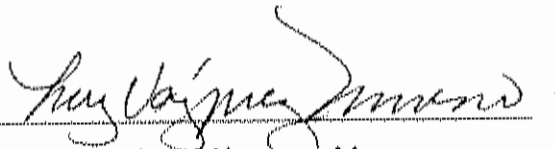
FEBRERO DEL 2007

APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para revisar la tesis de la Q.B. Dora Alicia Rodríguez Franco, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



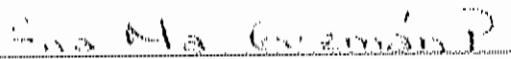
Dra. Gabriela Ramos Clamont
Directora de tesis



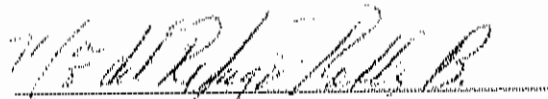
Dra. Luz Vázquez Moreno



Dra. Evelia Acedo Félix



M.C. Ana María Guzmán Partida



M.C. María del Refugio Robles Burgueño

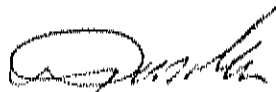
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se agradecen y se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización por escrito del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Apdo. Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, por la directora de tesis.

ATENTAMENTE



Dr. Alfonso Gardea Béjar
DIRECTOR GENERAL

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, primeramente a DIOS, por su infinito amor y por haberme permitido llegar a donde estoy, Gracias!!!

A **mi familia** porque se que siempre están ahí cuando los necesito, por ser mis incondicionales y por perdonarme todos aquellos momentos, buenos y malos, que dejé de vivir con ellos. Los quiero muchísimo no lo duden.

A **CONACYT** por el apoyo económico que me brindó.

A **CIAD** por acogerme en sus instalaciones y permitirme vivir esta experiencia.

A la **Dra. Ana María Calderón de la Barca** por permitirme conocer todas sus facetas, por su apoyo y sus palabras de aliento que sin duda me mantuvieron aquí hasta el final, Gracias por todo Dra.

A mi **Comité de tesis** por aceptar formar parte de él y hacerlo con la mejor disposición en todo momento.

A la **Dra. Gabriela Ramos Clamont** por sus enseñanzas y a las **Dras. Luz Vázquez Moreno** y **Evelia Acedo Félix** por compartir sus conocimientos conmigo y hacerlo con el mejor de los ánimos.

A las **M.C. Ana Ma. Guzmán Partida** y **Refugio Robles Burgueño** por su valiosa ayuda para la realización de esta tesis, por compartir sus conocimientos y experiencias y por su compañerismo invaluable.

A mis **compañeros de laboratorio** que siempre me mostraron una cara amigable, a los que con el paso del tiempo llegué a conocer y a estimar; porque cuando me cala

ellos me levantaban y me daban ánimos para seguir adelante. Gracias: Andre-i, Mónica, Moncho, Irlanda, Fernando, Gabriel, Ana Irene, Ana María y Cuquis. Especialmente a Gabriel, las Anitas y Cuquis, GRACIAS, no saben cuanto los quiero amigos.

A mis amigas Marcela, Mónica, Alejandra, Myriam, Maritza y Claudia por brindarme ese gran tesoro llamado AMISTAD, las quiero mucho.

DEDICATORIA

A **mi hijo** a ese hermoso ser que llegó a mi vida justo cuando iniciaba esta aventura, A él que vino a llenarnos de alegrías y bendiciones, a mi compañerito, a mi motor cuyo amor me alimentaba día con día y por el cual sali adelante. TE AMO CHIQUITIN!!!!

A **mi esposo** mi compañero fiel, tu apoyo, tu amor y tu optimismo me impulsaron para llegar a la meta. Gracias por toda tu comprensión y por no dejarme derrumbar aun en los peores momentos. TE AMO MI CORAZÓN!!!!

A **mi familia**, a ti mamita por tu amor incondicional, porque siempre estas ahí para apoyarme y respetar mis desiciones, TE ADORO MAMITA y a mis queridos hermanos, Cristina e Ivan, que sería de mi vida sin ustedes, son la sal y la pimienta; LOS QUIERO MUCHO.

*Por todo esto y mucho mas, les dedico este trabajo
con mucho cariño y respeto.*

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Características generales de la lactoferrina	3
II.2 Actividad antibacteriana	8
II.2.1 Mecanismos Directos	9
II.2.2 Mecanismos Indirectos	11
II.3 Aplicaciones clínicas potenciales	12
II.3.1 Efecto inmunomodulatorio	13
II.3.2 Actividad antimicrobiana	14
II.3.3 Lactoferrina en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en lechones	16
II.4 Purificación de la lactoferrina	17
III. OBJETIVOS	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	22
IV.1 Esquema general de trabajo	22
IV.2 Materiales	23
IV. 3 Muestras	23
IV.4 Purificación de las lactoferrinas	24
IV.4.1 Cromatografía de intercambio iónico	24
IV.4.2 Electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección	25
IV.5 Determinación de la actividad antibacteriana de las lactoferrinas	25
IV.5.1 Actividad bacteriostática	25
IV.5.2 Actividad bactericida	26

IV.6 Interacción <i>in vitro</i> de las lactoferrinas con <i>E. coli</i> K88.....	27
IV.6.1 Cultivo y biotilación de bacterias	27
IV.6.2 Ensayos de manchas	28
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
V.1 Purificación de lactoferrina bovina	29
V.2 Purificación de lactoferrina porcina.....	32
V.3 Determinación de la actividad antibacteriana de las lactoferrinas	37
V.3.1 Actividad bacteriostática.....	37
V.3.2 Actividad bactericida	43
V.4 Interacción <i>in vitro</i> de las lactoferrinas con <i>E. coli</i> K88	47
VI. CONCLUSIONES.....	53
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación de la molécula de lactoferrina.....	4
2	Sitios potenciales de N-glicosilación de lactoferrinas de diversas especies y posición que guarda la Lfcina dentro de la molécula..	6
3	Biorreconocimiento adhesina-carbohidrato.....	12
4	Principio físico de la cromatografía de intercambio catiónico.....	18
5	Esquema general de trabajo para el estudio de las lactoferrinas bovina y porcina.....	22
6	Cromatograma típico de la purificación de lactoferrina bovina por intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads.....	29
7	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación de lactoferrina bovina por cromatografía de intercambio iónico.....	31
8	Inmunodetección de lactoferrina bovina.....	32
9	Cromatograma típico de la purificación de lactoferrina porcina por intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads.....	33
10	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación de lactoferrina porcina por cromatografía de intercambio iónico.....	34
11	Inmunodetección de lactoferrina porcina.....	35
12	Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> K88 en presencia de 0.5 y 1 mg/mL de Apo-Lf porcina.....	38
13	Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> K88 en presencia de 0.5 y 1 mg/mL de Apo-Lf bovina.....	39
14	Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> K88 en presencia de 0.5 y 1 mg/mL de Holo-Lf porcina.....	40
15	Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> K88 en presencia de 0.5 y 1 mg/mL de Holo-Lf bovina.....	41
16	Efecto bactericida de las lactoferrinas bovina y porcina sobre <i>E. coli</i> K88 cultivada en caldo nutritivo.....	44

17	Efecto bactericida de las lactoferrinas bovina y porcina sobre <i>E. coli</i> K88 cultivada en peptona al 1%.....	45
18	Efecto bactericida de la lactoferrina bovina sobre <i>E. coli</i> K88 cultivada en peptona al 1% y caldo nutritivo.....	46
19	Efecto bactericida de la lactoferrina porcina sobre <i>E. coli</i> K88 cultivada en peptona al 1% y caldo nutritivo.....	46
20	Interacción <i>in vitro</i> de las lactoferrinas con <i>E. coli</i> K88.....	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Secuencia de aminoácidos de lactoferrinas de diferentes especies y posición que guardan dentro de la molécula de lactoferrina.....	5
2	Cuantificación de la purificación de la lactoferrina de suero de queso bovino y de suero de calostro porcino por cromatografía de intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads	37

RESUMEN

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de defensa que actúa contra patógenos Gram positivos y Gram negativos. Con el fin de comparar el efecto antibacteriano de las lactoferinas (Lfs) bovina y porcina sobre *Escherichia coli* K88, uno de los principales agentes etiológicos de las diarreas en lechones, así como de ensayar el reconocimiento de las adhesinas de esta bacteria a los oligosacáridos de ambas Lfs, se procedió a purificarlas a partir de suero de queso y calostro porcino. Las Lfs se purificaron utilizando una matriz de intercambio catiónico (SP Sefarosa Big Beads) obteniéndose en una sola fracción del proceso, al eluir con un gradiente de 0.01-1 M de NaCl. Este resultado fue confirmado por electroforesis SDS-PAGE en geles al 10% y por Western Blot. En los ensayos de actividad bacteriostática se encontró que la Apo-Lf bovina mostró un mayor efecto en la inhibición del crecimiento de la *E. coli* K88 que la Apo-Lf porcina. Las Holo-Lfs no presentaron dicha actividad. No se observó actividad bactericida al utilizar las lactoferinas en peptona al 1 %, sin embargo, se pudo apreciar una disminución significativa ($p < 0.05$) del crecimiento bacteriano dependiente de la concentración de Lfs, encontrándose una mayor actividad al utilizar 4 mg/mL de Lf bovina. Los ensayos de manchas mostraron diferencias en cuanto a la fuerza de la interacción entre *E. coli* K88 y las Lfs; se observó una mayor interacción de la Lf bovina que de la Lf porcina. Dicha interacción fue inhibida al oxidar a los oligosacáridos de las Lfs lo cual representa un indicio de que éstos son reconocidos por las adhesinas bacterianas de *E. coli* K88. Los resultados de los experimentos antes mencionados, indican que la fuente bovina presenta un mayor efecto bacteriostático *in vitro* sobre la bacteria, que la fuente porcina y que los oligosacáridos presentes en ambas Lfs son reconocidos por la adhesina de *E. coli* K88, por lo que podría ser útil en la prevención de la adhesión de la bacteria al tracto gastrointestinal de los lechones.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del tracto gastrointestinal en lechones presentan pérdidas económicas considerables para los porcicultores del país. La práctica regular para prevenirlas es el uso de antibióticos, los cuales pueden permanecer como residuos tóxicos en la carne y sus productos, o crear resistencia en diversas bacterias debido a su aplicación inadecuada. Esto último se agudiza, debido a la costumbre en las granjas porcícolas de administrar cantidades subterapéuticas de estos medicamentos al alimento del lechón, con el fin de promover su crecimiento. Actualmente, la tendencia mundial en el sector agroalimentario es la de garantizar la inocuidad de los productos que se consumen; es por ello que cada día se restringe más el uso de antibióticos y se promueve el de profilácticos, con el fin de prevenir infecciones más que el de tratarlas (Doyle, 2001; Mota, 1998). En este sentido, se están estudiando diversas proteínas de defensa, entre ellas la lactoferrina, la cual puede ser útil en la profilaxis de las enfermedades gastrointestinales de lechones debido a sus propiedades antibacterianas.

Existe evidencia de que los carbohidratos presentes en la Lf pueden interaccionar con las adhesinas bacterianas (Teraguchi *et al.*, 1996); estas interacciones pudieran estar involucradas en un mecanismo de defensa alternativo al de la privación del hierro y al de la generación de péptidos antimicrobianos. Se requieren estudios que confirmen esta función, ya que de esta manera la Lf pudiera interferir, por una vía adicional, en el proceso de colonización de las bacterias a las mucosas intestinales del cerdo. Debido a que la fuente comercial de Lf es el suero de queso bovino, una posibilidad sería suplementar a los cerdos con Lf bovina. Sin embargo, para garantizar la eficiencia de su uso, es necesario conocer cómo actúa esta molécula y qué tipo de interacciones puede establecer con los patógenos que atacan al lechón.

De la misma manera se requiere comparar la actividad antibacteriana de la Lf bovina con la de la porcina. Esta última se encuentra principalmente en el

calostro de la cerda desempeñando importantes funciones en la sobrevivencia del lechón. La comprobación del efecto antibacteriano *in vitro* de la Lf bovina sobre los enteropatógenos del cerdo permitiría explorar posteriormente su efecto *in vivo* en los lechones, sin afectar su fuente natural (Lf porcina) y confiriendo un valor agregado a una fuente sub-aprovechada en México, el suero de queso, el cual constituye un problema potencial de contaminación de suelos y aguas.

Los estudios de la interacción de los carbohidratos de la Lf con las adhesinas de los patógenos porcinos, requieren inicialmente de la proteína purificada. Para este fin se cuenta con métodos cromatográficos, los cuales presentan la ventaja de ser altamente específicos por otro lado, las condiciones de operación pueden ajustarse para evitar la disminución de la actividad biológica de las moléculas purificadas. A nivel industrial, la cromatografía de intercambio iónico es la más utilizada para la separación de las proteínas de la leche debido a la facilidad de éstas para disociarse en iones a un pH adecuado.

Este trabajo contempla la posibilidad de purificar Lfs bovina y porcina mediante cromatografía de intercambio iónico para, posteriormente, evaluar el efecto antibacteriano de ambas glicoproteínas contra *E. coli* K88; la cual es uno de los principales agentes causantes de diarreas en cerdos neonatos y recién destetados de la Región. Este estudio incluye además la búsqueda de posibles interacciones del tipo lectina-carbohidrato entre las adhesinas de *E. coli* K88 y los oligosacáridos de las Lfs.

II. ANTECEDENTES

II.1 Características generales de la lactoferrina

La lactoferrina es una glicoproteína de 80 kDa, pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, denominada transferrinas y es producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos (Levay y Viljoen, 1995). Se encuentra en secreciones corporales como lágrimas, saliva, fluidos seminales y vaginales y en la mucosa intestinal (Levay y Viljoen, 1995; Lönnerdal e Iyer, 1995). También se localiza en las vesículas secundarias de los neutrófilos y en el plasma sanguíneo (Borregaard *et al.*, 1993; van der Strate *et al.*, 2000). Sin embargo, es en la leche y particularmente en el calostro, donde se encuentra en mayor concentración (7 g/L de calostro humano) (Hirai *et al.*, 1990; Hennart *et al.*, 1991).

La molécula de Lf (Figura 1) está conformada por una cadena polipeptídica simple plegada en dos lóbulos globulares simétricos (lóbulos N y C) conectados por una región bisagra (Anderson *et al.*, 1989; Vorland, 1999). Cada lóbulo es capaz de unir un átomo de Fe^{2+} o Fe^{3+} en sinergismo con iones bicarbonato, aunque también puede unir iones de Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} (Levay y Viljoen, 1995; Lönnerdal e Iyer, 1995). Esta glicoproteína presenta un punto isoeléctrico (pI) entre 8.0-8.5 y una carga neta positiva a pH menores a su pI y varios sitios potenciales de N-glicosilación dependiendo de la especie (Hutchens *et al.*, 1994; Levay y Viljoen, 1995).

La lactoferrina se aisló por primera vez en 1960 a partir de las leches humana y la bovina; desde entonces a la fecha, se ha purificado a partir de la leche de la mayoría de los mamíferos (Montreuil *et al.*, 1997). Inicialmente, se pensó que su única función era la de transportar hierro al organismo. Hoy en día se sabe que la Lf funciona como una proteína de defensa que actúa como antioxidante, antimicrobiano, inmunomodulador y antiinflamatorio, entre otros efectos (Levay y Viljoen, 1995; Tomita *et al.*, 2002).

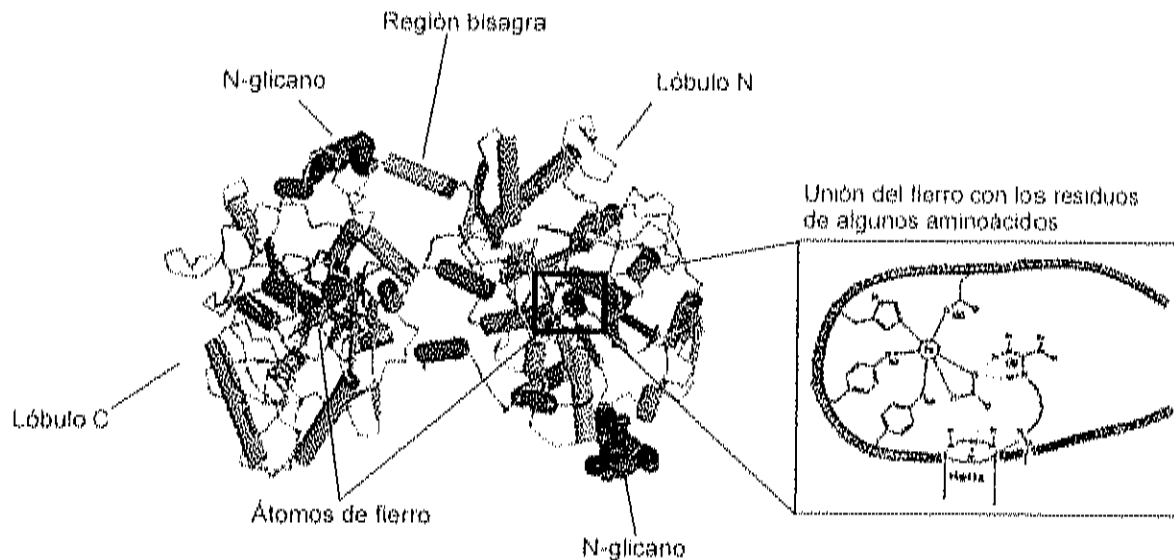


Figura 1. Representación de la molécula de lactoferrina. Se muestran los dos lóbulos (C y N), los sitios y aminoácidos que intervienen en la unión del hierro y dos sitios de N-glicosilación.

La secuencia de aminoácidos de la molécula de Lf de diferentes especies presenta una homología del 70% (Lydon *et al.*, 1992). El gen que codifica esta molécula se encuentra organizado en 17 exones y su tamaño varía de 23 a 35 Kb, entre la Lf humana (Johnston *et al.*, 1992; Panella *et al.*, 1991; Rado *et al.*, 1987), la murina (Cunningham *et al.*, 1992; Liu y Teng 1991; Shirsat *et al.* 1992), la bovina (Seyfert *et al.*, 1994) y la porcina (Teng, 1997). El número de aminoácidos codificados por 15 de los 17 exones es idéntico entre estas especies. Las principales diferencias se encuentran en los exones 2 y 11, en donde las Lfs murina, bovina y porcina contienen 1 ó 2 aminoácidos menos que la Lf humana. Además, la Lf porcina presenta dos deleciones adicionales en los exones 2 y 3 y una en el exón 4 (Teng, 2002).

La homología entre Lfs aumenta si se considera únicamente al extremo amino terminal (Tabla 1), el cual es determinante para la actividad antibacteriana de la molécula. Dicho extremo, comprendido entre los aminoácidos 12 al 48, contiene un péptido de 25 aminoácidos (17 al 41) denominado lactoferricina (Lfcina) el cual es especialmente activo contra bacterias Gram negativas. Es

importante resaltar que la Lfcina se obtiene de la hidrólisis de la Lf por las enzimas del sistema digestivo de los mamíferos y que presenta una actividad antibacteriana mayor que la molécula intacta (Vogel *et al.*, 2002).

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de lactoferrinas de diferentes especies y posición que guardan dentro de la molécula de lactoferrina.

FUENTE	SITIO ACTIVO DEL EXTREMO N TERMINAL (Lfcina)	POSICIÓN
Lf bovina	FKCRRWQWRMKKLGAPS I TCVRRFAFA	17-42
	SOPEWFKCRRWQWRMKKLGAPS I TCVRRFAFALECIRA	12-48
Lf caprina	SKCYQWQRRMRKLGAPS I TCVRR TSA	17-42
	VLPEWS0b0s10v1PWSYQWQRRMRKLGAPS I TCVRR TSALECIRA	12-48
Lf humana	TKCFQWQRNMRKVRGPPVSC I KRDSP	17-42
	SOPEA TKCFQWQRNMRKVRGPPVSC I KRDSPIOCIOA	12-48
Lf porcina	SKCROWQSK I RRTN - P I F - C I RRASP	19-42
	STA EY SKCROWQSK I RRTN - P I F - C I RRASPTDCIRA	14-48

Las negritas indican los aminoácidos coincidentes en las cuatro especies
FUENTE: Bellamy *et al.*, 1992a.

La similitud estructural entre las Lfs hace pensar que el comportamiento biológico de esta molécula en las distintas especies es el mismo. Sin embargo, existen diferencias importantes que justifican la realización de estudios comparativos. Por ejemplo, el extremo amino terminal de la molécula que inicia con glicina seguida de cuatro argininas que únicamente posee la Lf humana, le confiere una mayor actividad bactericida que al resto de las lactoferrinas (Baveye *et al.*, 1999; Legrand *et al.*, 1998; Mann *et al.*, 1994; Nibbering *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999). Otros estudios revelan que las moléculas completas de Lfs caprina y ovina presentan mayor actividad antibacteriana que la de las Lfs bovina y humana, mientras que se desconoce el efecto de la Lf porcina (Lee *et al.*, 1997; Recio y Visser, 2000).

Una variación importante en la estructura de la Lf de diferentes especies, es el número de sitios de N-glicosilación presentes en la cadena polipeptídica de la Lf. Se distinguen dos tipos: Lfs que presentan uno o dos sitios de glicosilación del

tipo N-acetilactosamina y aquellas con glicanos tipo altos en manosa y complejos (con N-acetilactosamina) que ocupan hasta cinco sitios de glicosilación. Los glicanos de las Lfs se pueden localizar en ambos dominios (N y C) (Montreuil *et al.*, 1997).

La Lf humana posee tres sitios potenciales de glicosilación (Asn-138, 479 y 624), de los cuales la Asn-138 y la Asn-479 se encuentran ocupados. También se ha reportado una glico-variante en el Asn-624 (Figura 2). Por otro lado, la Lf bovina posee cinco sitios potenciales de glicosilación (Asn-233, 281, 368, 476 y 545), aunque únicamente se ha demostrado la presencia de cuatro glicanos, siendo la Asn-281 la que no se encuentra glicosilada. Los oligosacáridos de la Lf bovina presentan un alto grado de heterogeneidad estructural. Las estructuras complejas del tipo N-acetilactosamina contienen la estructura Gal(β 1-4)GlcNAc unida al Asn-476. Al igual que la Lf bovina, la Lf caprina cuenta con cinco sitios potenciales de glicosilación, sin embargo, no se han identificado sus estructuras. En cambio, la Lf porcina cuenta con tres sitios potenciales de N-glicosilación los cuales se han localizado en el lóbulo C-terminal (Asn-366, 472 y 571); los oligosacáridos de dichas estructuras son del tipo complejo, aunque solo se han podido detectar en un solo sitio (Montreuil *et al.*, 1997).

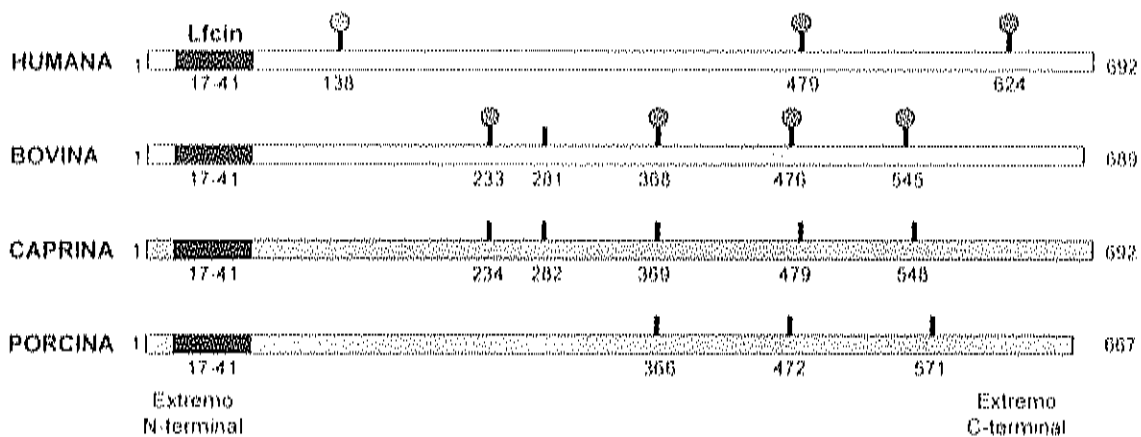


Figura 2. Sitios potenciales de N-glicosilación de lactoferrinas de diversas especies y posición que guarda la lactoferrina dentro de la molécula. Los círculos azules indican las estructuras elucidadas.

Las principales fuentes comerciales de Lf son el suero de queso y la leche descremada, ambas de origen bovino (Tomita *et al.*, 2002). Para el año de 2003, se estimó una producción mundial de 73 toneladas de Lf, siendo Nueva Zelanda el principal productor y los países asiáticos (Japón, Corea, China y Taiwán), los principales consumidores (Wakabayashi *et al.*, 2006). Debido a que México es un importante productor de queso, existe en el país el potencial para producir lactoferrina y otras proteínas a partir del suero. Sin embargo, este subproducto no se aprovecha o se sub-explota constituyendo un problema potencial de contaminación ambiental. Se calcula que la cantidad de suero residual es 9 veces mayor que la del queso obtenido (Castro, 2003). Una producción de 260,000 toneladas de queso, como la que se estimó para el 2003 en nuestro país, genera más de 2,000,000 toneladas de suero, a partir del cual se pudieran obtener hasta 200 Kg de Lf y 10-20 veces más de otras proteínas de gran valor nutraceútico y alimentario, como las inmunoglobulinas, lactoalbúminas, etc. (Early, 2000; Castro, 2003).

La capacidad contaminante del suero se ve reflejada en su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) la cual es mayor o igual a 12.1 g/L (Grasselli *et al.*, 1997). Esto significa que una pequeña planta que produce 80 Kg. de queso al día contamina lo mismo que 218 personas. El aislamiento y purificación de las proteínas de estos subproductos para su posterior utilización, contribuiría significativamente a la disminución de las descargas contaminantes debidas a la elaboración de quesos. La Lf comercial se utiliza principalmente en la elaboración de fórmulas infantiles, en el enriquecimiento de bebidas y de productos lácteos y en la elaboración de productos para el cuidado dental y de la piel (Tomita *et al.*, 2002). En los últimos años, ha aumentado el interés por utilizar a la lactoferrina comercial en la prevención y combate de diversos tipos de infecciones animales (Wakabayashi *et al.*, 2006). Sin embargo, es importante investigar primero, si esta fuente resulta efectiva contra microorganismos que atacan a otras especies como por ejemplo los cerdos.

En el presente trabajo de investigación se evaluará el efecto antibacteriano de las Lfs bovina y porcina. En caso de que la Lf bovina presentara igual o mayor actividad que la porcina contra la adhesión de patógenos al intestino del lechón, ésta podría probarse, en un futuro, como profiláctico en diarreas infecciosas de lechones. Lo anterior, es de suma importancia para estados porcicultores como Sonora, donde las etapas más críticas de la producción son la lactancia y el destete. Las características de la placenta de la cerda impiden la transferencia de proteínas de defensa al embrión, por lo que los lechones nacen especialmente susceptibles a las enfermedades infecciosas, dependiendo del calostro de la madre para su sobrevivencia. La tendencia cada vez más frecuente de destetar al cerdo a temprana edad, lo hace más susceptible a contraer infecciones gastrointestinales que los llevan a la muerte o a una costosa recuperación.

II.2 Actividad antibacteriana

La lactoferrina presenta actividad antibacteriana sobre un amplio espectro de patógenos, incluidos hongos, bacterias y virus (Levay y Viljoen, 1995). Lo anterior se debe a que esta molécula se encuentra estratégicamente situada en las mucosas de los mamíferos, donde actúa como primera línea de defensa contra las infecciones. El efecto de la Lf contra bacterias patógenas, ha sido ampliamente documentado *in vitro* e *in vivo* (Levay y Viljoen, 1995; Lönnerdal e Iyer, 1995). La Lf inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas; entre ellas: *E. coli*, *S. typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *B. stearothermophilus* y *B. subtilis* (Pakkanen y Aalto, 1997). También muestra efecto bacteriostático y bactericida *in vitro* y en modelos animales, contra múltiples cepas de *Helicobacter pylori* e inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* y *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos y *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Dial y Lichtenberger, 2002; Bhimani *et al.*, 1999).

La molécula de Lf protege a los mamíferos de las infecciones bacterianas mediante mecanismos directos e indirectos. Los primeros involucran la actividad

bacteriostática y bactericida, mientras que los indirectos se basan en la prevención de la adhesión de los patógenos a las células eucariotas y en la modulación del sistema inmune (Ward *et al.*, 2002).

II.2.1 Mecanismos Directos

El hierro juega múltiples e importantes funciones biológicas en todas las especies vivas. En consecuencia, es fundamental en las relaciones huésped-parásito, ya que es un factor crítico para el crecimiento y expresión completa de los factores de virulencia de las bacterias patógenas *in vivo* (Águila y Brock, 2001).

La función bacteriostática de la Lf se debe a su capacidad para ligar hierro (Ward *et al.*, 2002). Debido a que la molécula se encuentra en las secreciones principalmente como Apo-Lf (forma libre de hierro), tiene la posibilidad de secuestrar al metal en los sitios de infección, privando a las bacterias de un nutriente esencial para su crecimiento (Bullen *et al.*, 1978; Bezwoda y Mansoor, 1989).

La bacteriostasis es únicamente una medida antibacteriana temporal, ya que muchas bacterias han desarrollado mecanismos para recuperar el hierro secuestrado por la Lf. Este es el caso de algunas bacterias Gram negativas, que sintetizan moléculas quelantes pequeñas conocidas como sideróforos (Crosa, 1989). Otros organismos como los del género *Neisseria*, son capaces de expresar receptores transmembranales específicos para Lf, internalizando en sus células el hierro unido a la proteína (Lewis *et al.*, 1998; Schryvers *et al.*, 1998).

La capacidad bactericida de la Lf se atribuye a la interacción directa de la molécula o parte de ella, con las superficies bacterianas (Tomita *et al.*, 1994). Esta interacción se ha observado en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los estudios con bacterias Gram positivas como *Streptococcus mutans*, *Micrococcus sp.* y *Clostridium sp.*, muestran que las Lfs bovina y humana son capaces de

unirse a las superficies bacterianas debido a su carga positiva (de Lillo, 1998). Sin embargo, se requieren más estudios para conocer cómo afecta esta unión a las bacterias.

En bacterias Gram negativas como *V. cholerae* y *E. coli*, se ha detectado la interacción de la Lf bovina con la superficie bacteriana, seguida de la liberación de lipopolisacárido (LPS), el aumento en la permeabilidad de la membrana y la liberación del contenido citoplasmático de la bacteria (Yamauchi *et al.*, 1993; Ellass-Rochard *et al.*, 1998). El LPS es el componente endotóxico de la pared celular de las bacterias Gram negativas, este se adhiere a los receptores de la célula hospedera, como un primer paso para la infección (Riechtiel *et al.*, 1994).

Los estudios con Lf, indican que una secuencia específica de aminoácidos catiónicos, localizados en el extremo N-terminal, es la que interacciona con el LPS. Lo anterior ha sido reforzado, al comprobar que la Lfcina, un péptido del extremo N-terminal de la Lf (aminoácidos del 1-47 para la Lfcina humana y del 17-41 para la bovina) liberado por la acción de la pepsina gástrica, presenta la misma capacidad de unirse al LPS (Tomita *et al.*, 1994; Bellamy *et al.*, 1992a y 1992b). También se ha observado un aumento de la actividad antimicrobiana, al modificar químicamente a los péptidos de la Lf, aumentando sus cargas positivas (Majertle *et al.*, 2003).

Varios péptidos catiónicos o policationicos antibacterianos, como la polimixina B, las defensinas, magaininas, cecropinas, e indolicidina alteran la estructura del LPS. Estos péptidos desestabilizan la unión de esta molécula con los cationes presentes en la superficie bacteriana, como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} , provocando la liberación del mismo. Lo anterior, ocasiona alteraciones en la conformación y permeabilidad de la pared y de la membrana bacteriana (Marra *et al.*, 1990; Borregaard, 2001). Se piensa que la Lf actúa de manera similar a los péptidos microbianos debido a su naturaleza catiónica (Ward *et al.*, 2002). Se han llevado a cabo estudios *in vivo* e *in vitro* con péptidos sintéticos que indican, que la

actividad antibacteriana de la Lf humana, se debe a la presencia de 4 argininas cargadas positivamente, localizadas entre los aminoácidos 1 y 5 de su extremo N-terminal (van Berkel *et al.*, 1997; Ellass-Rochard *et al.*, 1998).

II.2.2 Mecanismos Indirectos

Además de sus propiedades biocidas y biostáticas, la Lf puede proteger a las células epiteliales de la invasión microbiana, previniendo su adhesión o internalización (Longhi *et al.*, 1993). En este sentido se ha observado que la Lf presenta actividad de serina proteasa, la cual ataca específicamente a las proteínas de membrana de *Haemophilus influenzae* involucradas en la adhesión de esta bacteria a la célula hospedera (Qiu *et al.*, 1998). Otra estrategia de la Lf es la de competir por los sitios de unión de moléculas que sirven de receptores al patógeno, como los glicosaminoglicanos presentes en la mucosa intestinal. Adicionalmente, algunos estudios indican que los oligosacáridos de algunas glicoproteínas como la Lf pueden a su vez actuar como receptores de las adhesinas de los patógenos, previniendo así la invasión microbiana (Teraguchi *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2000).

La adherencia de la bacteria a las superficies mucosas mediada por lectinas, es considerada como el paso inicial de las infecciones bacterianas (Ofek y Beachey, 1979). Varias especies (patógenas y no patógenas) de la familia *Enterobacteriaceae* expresan fimbrias tipo 1 las cuales expresan en su ápice subunidades con función de lectina (Abraham *et al.*, 1988). Lo anterior permite a la fimbria reconocer glicanos del tipo oligomanosídicos sobre la superficie de células eucarióticas como receptores (Giampapa *et al.*, 1988).

La Lf bovina presenta cuatro glicanos de los cuales, al menos dos, son del tipo oligomanosídico (Spik *et al.*, 1993). Esto anticipa que estos glicanos pueden funcionar como receptores para las lectinas de las fimbrias de tipo 1 (Figura 3A). Sin embargo, las interacciones lectina-glicoproteína no siempre son predecibles

(Teraguchi *et al.*, 1996). Se ha sugerido que el mecanismo que sigue la inmunoglobulina A (IgA) para unirse a estas fimbrias (Wold *et al.*, 1990) es el mismo que para la Lf. Sin embargo, se requiere de nuevas investigaciones para probarlo.

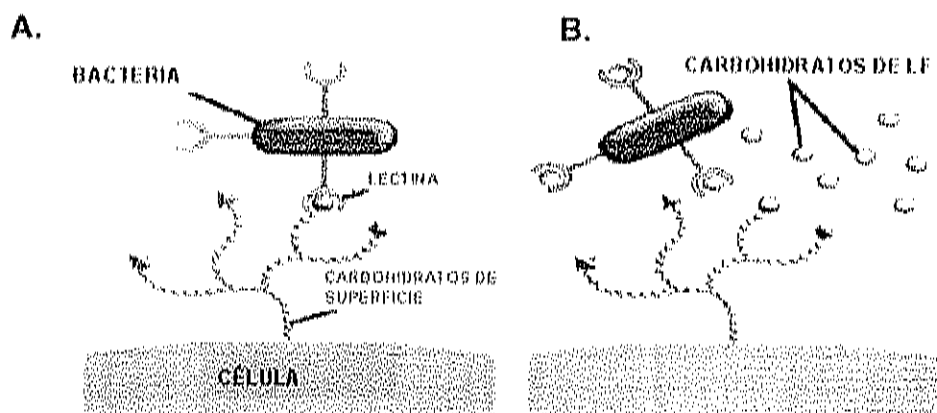


Figura 3. Biorreconocimiento adhesina-carbohidrato. (A) Se observa la adhesión de los carbohidratos de la superficie celular y las lectinas (adhesinas) bacterianas y, (B) la posible adhesión de los oligosacáridos de la lactoferrina a las adhesinas bacterianas. FUENTE: Sharon y Lis, 1993.

II.3 Aplicaciones clínicas potenciales

La potencialidad de la lactoferrina en aplicaciones biológicas, farmacológicas y nutraceúticas ha llamado la atención de los científicos, debido a su amplia gama de efectos biológicos que incluyen su uso como inmunomodulador, anticancerígeno y antimicrobiano (Iigo *et al.*, 1999; Tomita *et al.*, 2002; Trumpler *et al.*, 1989). Debido a que diversos estudios muestran que no existe diferencia entre la actividad antibacteriana de las Lfs humana y bovina, por lo que la principal fuente comercial de Lf es la leche bovina.

Existen muy pocos trabajos en los que la Lf se utiliza de manera intraperitoneal o intravenosa. Entre ellos destaca el de Zagulski *et al.* (1998),

quienes aplicaron inyecciones de Lf a ratones 24 h antes de inducirles una infección con *E. coli* enteropatógena. Ellos observaron que esta glicoproteína previno la mortalidad de los roedores hasta 30 días después de que se manifestó la infección.

En humanos, la manera natural de administrar Lf es vía oral. Reiter (1985), estimó que la alimentación de infantes neonatos con leche materna permite la ingestión de 3 g de Lf por día, durante la primera semana de vida. Esta Lf actúa como primera línea de defensa en las mucosas intestinales y promueve el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos. Esto último es importante, ya que estas bacterias cuentan con diversas estrategias para combatir a los enteropatógenos: producen ácido, bacteriocinas, y compiten por los sitios de adhesión en la mucosa y en el epitelio gastrointestinal (GI) (Trumpler *et al.*, 1989). Además, gran parte de la Lf se absorbe intacta en el intestino de los neonatos, permitiendo su distribución por el torrente sanguíneo hacia sitios de infección lejanos del tracto GI (Kawaguchi *et al.*, 1989). Lo anterior abre un campo de posibilidades para las aplicaciones clínicas y profilácticas de la Lf en fórmulas para lactantes (Roberts *et al.*, 1992).

11.3.1 Efecto inmunomodulatorio

En adultos humanos y animales, una parte de la Lf administrada oralmente se degrada en péptidos bioactivos debido a la acción de la pepsina, mientras que la otra parte permanece intacta pero presenta una absorción intestinal muy pequeña (Troost *et al.*, 2002). En estos casos se puede suponer que el mecanismo de protección de la Lf es el de activar al sistema inmune ya que esta glicoproteína influye en la respuesta sistémica de diferentes maneras. Una de ellas es la regulación de la actividad de los macrófagos y la proliferación de linfocitos mediante mecanismos aún no elucidados. Sin embargo, su acción más importante se relaciona con los neutrófilos polimorfonucleares, ya que además de actuar como fagocitos, son capaces de descargar gránulos de Lf en el plasma sanguíneo

poniéndola en contacto con los microorganismos invasores (Levay y Viljoen, 1995; Ward *et al.*, 2002).

En el sistema inmune de las mucosas de modelos animales y de humanos, se han reportado diversos efectos inmunomoduladores después de haber sido suplementados con Lf por vía oral. Debbabi *et al.* (1998), observaron un incremento en los niveles de IgA e IgG en el fluido intestinal de ratones y la proliferación de placas de Peyer y esplenocitos. Además, la administración de hidrolizados de Lf, provocó un aumento de células NK y linfocitos T del tipo CD4+ y CD8+ en la sangre y en el intestino delgado de ratones (Iigo *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000), mientras que la molécula intacta, indujo la secreción de IL-18, IL-10 e interferón γ (Iigo *et al.*, 1999; Nakajima, 1999; Wang *et al.*, 2000).

Otros estudios en humanos muestran que la administración de Lf, induce el aumento de células Th0 y Th1 en sangre (Ishii *et al.*, 2000; Zimecki *et al.*, 1998). El conjunto de estas observaciones, soporta la idea de que la Lf y sus péptidos, pueden modular el sistema inmune de la mucosa intestinal protegiéndola contra las infecciones (Tomita *et al.*, 2002). Se piensa que la Lf se une a receptores localizados en las células del epitelio intestinal y del tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés, gut associated lymphoid tissue). Esta interacción provoca un aumento en la producción de citocinas y quimiocinas y estimula directamente a los linfocitos del GALT (Tomita *et al.*, 1994; Zimecki *et al.*, 1998).

II.3.2 Actividad antimicrobiana

Los principales estudios en humanos relacionados con la actividad antimicrobiana de la Lf, están dirigidos hacia el efecto de esta glicoproteína sobre *H. pylori* y el virus de la Hepatitis C. En 150 pacientes positivos para *H. pylori*, se observó un 100% de erradicación de la bacteria en pacientes que recibieron el tratamiento convencional (antibióticos) más Lf y un 73% en los que únicamente

recibieron antibióticos (Di Mario *et al.*, 2003). En un estudio piloto se administró Lf (dosis: 1.8-3.6 g/día) a 11 pacientes con hepatitis C crónica durante 8 semanas, se observó la disminución significativa de la alanina transaminasa sérica y de los conteos de carga de ARN viral, en aquellos pacientes que mostraron un conteo viral inicial bajo (≤ 100 kcopias/mL de ARN), no se observaron efectos adversos (Tanaka *et al.*, 1999). En la actualidad, se realizan estudios en 10 hospitales de Japón para probar la efectividad de la Lf en pacientes con hepatitis B y C. Los primeros resultados confirman su poder en pacientes con títulos virales bajos (Ishii *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 1999; Tomita *et al.*, 1994).

Una de las aplicaciones potenciales de la Lf que requiere de estudios *in vivo*, tanto en modelos animales como en humanos, es la de explotar el sinergismo que muestra *in vitro*, con algunos medicamentos. Este es el caso de antifúngicos como el fluorazol, del AZT utilizado en pacientes con HIV, o de diversos antibióticos.

Otro aspecto muy importante en clínica, es el uso de moléculas bioactivas como acarreadores de medicamentos antivirales. La ventaja es que dichas moléculas se dirigirían únicamente hacia las células afectadas por el virus, lo que permitiría utilizar dosis de medicamento más bajas, disminuyendo sus efectos tóxicos y colaterales. Los principales estudios hasta el momento, se basan en el ensamble de medicamentos a proteínas modificadas químicamente. La idea es que las proteínas conserven su actividad antimicrobiana y que a la vez, puedan dirigirse específicamente hacia las células o tejidos infectados, acarreado un medicamento que también combata al patógeno causante de la infección (Swart *et al.*, 1996 y 1999). El interés por el uso de Lf en este sentido es grande, debido a su amplio espectro contra virus, hongos y bacterias.

En cuanto al campo de la industria alimentaria, se ha observado que la Lf inhibe el crecimiento de *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* y *Campylobacter sp.* en carne de res y en productos cárnicos (Shin *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 1975). Debido

a lo anterior, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de Norteamérica (FDA, por sus siglas en inglés), ha aprobado el uso de preparaciones de Lf para aplicarse en forma de spray a las superficies cárnicas.

II.3.3 Lactoferrina en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en lechones

La Lf puede actuar independiente o sinérgicamente con otras moléculas para limitar el crecimiento y la adherencia de bacterias enteropatógenas, a receptores oligosacáridos de la superficie de la mucosa intestinal (Roberts *et al.*, 1992; Kunz y Rudloff, 1993; Teraguchi *et al.*, 1996; Newburg, 2000). En cerdos, la aplicación de Lf bovina en conjunto con gentamicina, kanamicina u otros antibióticos, mostró un efecto sinérgico al inhibir *E. coli* enteropatógena a concentraciones mínimas inhibitorias de antibiótico (Chen *et al.*, 2004).

La Lf también puede actuar sola inhibiendo el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella sp.* (Naidu *et al.*, 2003; Sarelli *et al.*, 2003). Lo anterior es importante sobre todo en la industria de la producción de carne, en la que la tendencia mundial es la de prevenir las diarreas con profilácticos en vez de tratarlas con antibióticos. Esto representa un reto sobre todo en las etapas de producción animal, en las que se presenta una mayor susceptibilidad a las diarreas, por ejemplo, en las etapas de lactancia y destete de los lechones (Thulin, 1989; Utrera, 2003).

Las diarreas de origen infeccioso en lechones son probablemente una de las condiciones patológicas más costosas para la industria porcícola (Hog y Torres, 1997). Estas enfermedades reducen la eficiencia alimentaria, aumentando los costos de alimentación un 10-12%. Además, elevan los gastos por tratamiento médico en un 50% (mayor uso de antibióticos), la mortalidad en un 3% y retrasan el tiempo de sacrificio de 2 a 3 días por día de enfermedad (Carvajal, 2000).

Los problemas gastrointestinales en las granjas porcícolas son muy comunes, presentando una prevalencia del 30 al 50% (Carvajal, 2000). En lechones neonatos las diarreas infecciosas más frecuentes son causadas por los rotavirus y por *E. coli* en el 63% de los casos (USDA, 1992). Mientras que en los cerdos recién destetados los principales agentes etiológicos son *E. coli* y *Salmonella sp.* En la región noroeste de la República Mexicana son de particular importancia *E. coli* K88 y *S. choleraesuis* (Carvajal, 2000).

Debido a lo anterior, continuamente se investigan opciones al tratamiento de diarreas que puedan aplicarse como estrategias preventivas para disminuir el uso de medicamentos (Doyle, 2001). Una alternativa profiláctica a las diarreas podría ser el uso de preparaciones conteniendo lactoferrina.

II.4 Purificación de la lactoferrina

El aislamiento y purificación de proteínas se basa en estrategias que exploten propiedades físicas químicas y biológicas de la molécula tales como su carga, su tamaño, su solubilidad, o sus propiedades de unión específica a otras moléculas. En base a lo anterior, las proteínas pueden separarse por diversos métodos entre los que destacan la precipitación por salado o con solventes y los métodos cromatográficos. Estos últimos presentan la ventaja de ser más específicos y flexibles en lo que al establecimiento de condiciones se refiere, lo que permite preservar más fácilmente la estabilidad y la actividad biológica de la proteína purificada (Burnouf, 1995).

El método de purificación de Lf más utilizado a nivel industrial es la cromatografía de intercambio iónico (Wakabayashi *et al.*, 2006; Huffman y Harper, 1999). Esta técnica se basa en las diferencias en el tipo y la magnitud de la carga eléctrica neta de las proteínas a un valor de pH determinado. La matriz de la columna es un polímero sintético al que se unen grupos cargados. La carga de la matriz, y la de las proteínas, dependerá del pH del solvente y de la fuerza iónica.

En determinadas condiciones, las proteínas serán retenidas en la matriz que presente una carga contraria (las proteínas cargadas positivamente serán retenidas por una matriz cargada negativamente), siendo eliminadas las restantes como se esquematiza en la figura 4. Para eluir las proteínas retenidas se modifica la fuerza iónica del solvente o su pH, bajando el pH para un intercambiador aniónico o subiéndolo en un intercambiador catiónico (Scopes, 1993). De este modo se debilitan las interacciones electrostáticas que retienen a las proteínas adsorbidas en la matriz. El cambio que promueva la elución puede llevarse a cabo en un solo paso o gradualmente utilizando gradientes que varíen el pH o la fuerza iónica (Skoog y Leary, 1992).

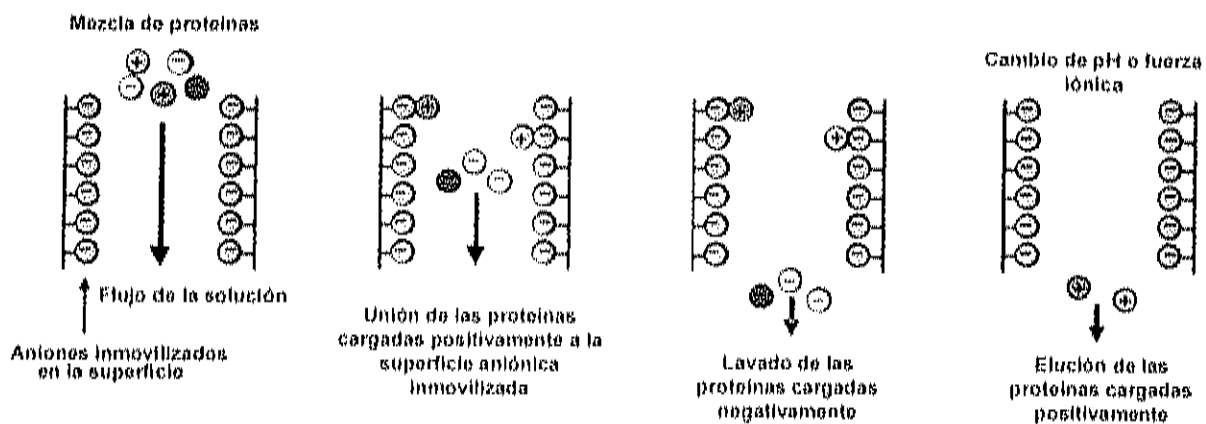


Figura 4. Principio físico de la cromatografía de intercambio catiónico.

FUENTE: <http://www.wine.sb.fsu.edu/BCH4053/Lecture07.html>

Debido a que la Lf presenta carga positiva, puede ser purificada con una matriz de intercambio catiónico, como la carboximetil celulosa unida a Sefadex (Yoshida *et al.*, 2000; Law y Reiter, 1977). Mediante este procedimiento la leche descremada (pH 6.7) o el suero de queso (pH 6.4), se filtran y se aplican a columnas cromatográficas industriales. La lactoferrina se eluye utilizando una solución de NaCl al 5%, se dializa y se concentra por ultrafiltración; posteriormente se liofiliza después de un tratamiento leve con calor o se seca por aspersion después de esterilizarse por filtración (Wakabayashi *et al.*, 2006)

A nivel de laboratorio se han evaluado otras técnicas cromatográficas para la purificación de Lf. Hutchens *et al.* (1989), inmovilizaron ADN en agarosa para purificar lactoferrina humana, aprovechando su propiedad de interaccionar con el ácido desoxirribunucleico. El grupo de Porath (1977), reportó la purificación de Lf humana utilizando cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), utilizando cobre, seguida de filtración en gel. Por otro lado Torres *et al.* (1979) lograron purificar Lf en un solo paso, a partir de los gránulos de los neutrófilos de cerdos de Guinea, utilizando matrices de IMAC con cobre. El uso de cromatografía de afinidad utilizando matrices de agarosa-heparina fue reportado por primera vez para la purificación de Lf humana por Blackberg y Hernell en 1980. Posteriormente, Wang *et al.* (1984) utilizaron este mismo método para obtener Lfs humana y bovina a partir de leche descremada y jugo pancreático.

La cromatografía de intercambio iónico también ha sido utilizada para la purificación de Lf a nivel laboratorio. Elliot *et al.* (1984), obtuvieron Lf de calostro porcino utilizando una columna de carboximetil-celulosa. Para lograrlo hubo que añadir algunos pasos como la eliminación de grasa, la obtención de suero por acidificación del calostro y su filtración. Yoshida y Ye-xiuyin (1991), purificaron Lf a partir de suero bovino utilizando una serie de filtraciones para eliminar grasa y caseína residuales. Posteriormente, precipitaron las proteínas con sulfato de amonio, las resuspendieron y pasaron por una columna de interacción hidrofóbica, utilizando una matriz butilada (ButilToyopearl-650 M) y por último por una matriz de carboximetil-Toyopearl (CM-TP) en la que se eluyó la Lf utilizando un gradiente de NaCl de 0-0.55 M.

Yoshida *et al.* (2000), Wei *et al.* (2000 y 2001) y Griffiths *et al.* (2003), purificaron Lf bovina utilizando matrices de CM-TP o de CM-Sefarosa. Sin embargo, la purificación no se llevó a cabo al 100%, a pesar de que se incluyeron numerosos pasos como la filtración, la precipitación con sales y la recromatografía.

Una nueva alternativa para purificar Lf en grandes cantidades a nivel laboratorio es la propuesta por Doultani *et al.* (2004) y Fee y Chand (2006), los cuales utilizaron esferas de Sefarosa sulfatada de mayor tamaño que lo normal (del inglés SP Sepharose Big Beads). Esta técnica presenta la ventaja de que se pueden aplicar hasta 2 L de suero sin filtrar a una columna de SP Sefarosa, con un volumen de cama de 10 mL. La adsorción de proteínas se promueve en presencia de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 10 mM, pH 6.7 (Solución A). Las proteínas débilmente unidas, se eliminan aumentando la fuerza iónica, de la solución A con NaCl 0.1 M. Finalmente, la elución se promueve en presencia de sal desarrollando un gradiente de 0.1–1 M de NaCl, utilizando la misma solución amortiguadora. Por las ventajas que presenta esta técnica, este estudio contempla la posibilidad de purificar Lfs bovina y porcina, mediante cromatografía de intercambio iónico con la metodología propuesta por Fee y Chand (2006), para posteriormente evaluar su efecto antibacteriano contra *E. coli* K88, con la posibilidad de una posterior aplicación en la industria porcícola.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Purificar lactoferrinas bovina y porcina y evaluar su efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* K88.

Objetivos Específicos

1. Purificar lactoferrina por cromatografía de intercambio iónico a partir de suero de queso bovino y calostro porcino.
2. Determinar la actividad bacteriostática y bactericida de ambas lactoferrinas sobre *E. coli* K88.
3. Ensayar la adhesión *in vitro* de *E. coli* K88 a las estructuras oligosacáridas de ambas lactoferrinas, utilizando ensayos de manchas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Esquema general de trabajo

Este estudio se dividió en dos etapas (Figura 5) que comprenden:

- La purificación de Lfs bovina y porcina utilizando cromatografía de intercambio iónico.
- La comparación de la actividad antibacteriana de las Lfs bovina y porcina contra *E. coli* K88 y la caracterización parcial de la adhesión de esta bacteria a los oligosacáridos de las Lfs.

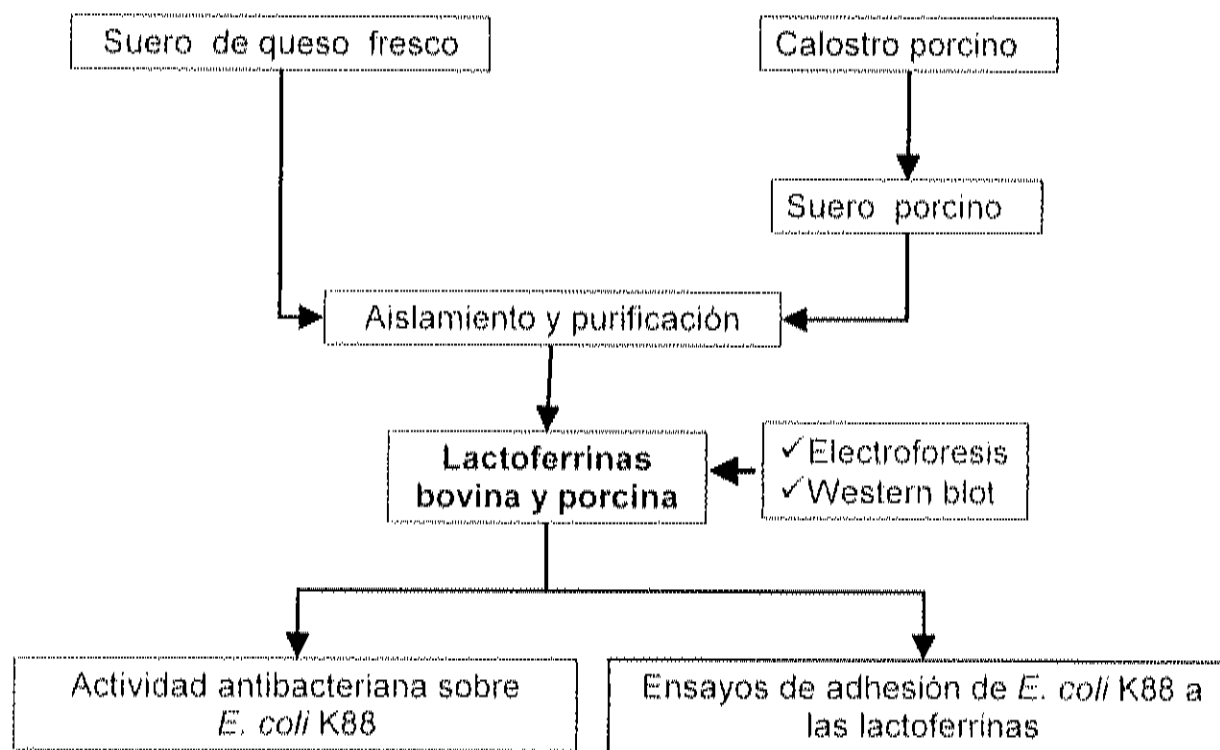


Figura 5. Esquema general de trabajo para el estudio de las lactoferrinas bovina y porcina.

IV.2 Materiales

Los medios microbiológicos se obtuvieron de Difco Lab (Detroit, MI, EUA). Los ensayos de inmunodetección se realizaron con anti-Lf bovina producida en cabra y anti IgG de cabra ligada a peroxidasa producida en conejo de los Laboratorios Bethyl Labs (Montgomery, TX, EUA). La matriz cromatográfica SP Sefarosa Big Beads se adquirió en GE Healthcare (Upsala, Suecia). El resto de los reactivos utilizados se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

IV. 3 Muestras

La Lf bovina se purificó a partir de suero de leche producto de la elaboración de queso fresco. El suero se obtuvo de productores artesanales de la región, localizados en las inmediaciones del aeropuerto de la ciudad de Hermosillo y en el ejido La Victoria. Se realizaron tres muestreos durante el 2005 y tres muestreos mas en el 2006; en cada uno se tomaron 4 L. de suero. Inmediatamente después de su obtención el suero fue transportado en condiciones de refrigeración al Laboratorio de Bioquímica de Proteínas del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). El suero se centrifugó a 3200 rpm por 20 min a 4°C y se filtró utilizando papel filtro watman No.1, fibra de vidrio y una membrana de 0.45 µm (aplicando vacío). Estos tratamientos se realizaron con el fin de facilitar la aplicación del suero a las columnas cromatográficas y de evitar la proliferación de bacterias acidificantes (Chen y Chiahung Mao, 2004). Posteriormente el suero se separó en alícuotas y almacenó en tubos a -40°C hasta su uso.

La Lf porcina se purificó a partir de calostro obtenido de dos granjas porcícolas del municipio de Hermosillo, Sonora. Se realizaron tres muestreos de 600 mL de calostro provenientes de cuatro cerdas recién paridas. Las muestras se transportaron al CIAD en envases estériles a 4°C y se centrifugaron a 3500 rpm por 20 min a 4°C para eliminar la grasa. Posteriormente se aplicó un tratamiento

con HCl 0.5 N a 20°C, pH 4.6 para precipitar a la caseína, la cual fue separada por centrifugación bajo las condiciones mencionadas anteriormente (Chen y Chiahung Mao, 2004; Ramos Clamont, 2003). El suero resultante se filtró siguiendo el mismo procedimiento que para el suero bovino. Por último, se ajustó el pH a 7 con Trizma base 3M, pH 10. Se separó en alícuotas y se almacenó en tubos a -40°C hasta su uso.

IV.4 Purificación de las lactoferrinas

IV.4.1 Cromatografía de intercambio iónico

La purificación de las Lfs bovina y porcina se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando el equipo cromatográfico ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se utilizó como fase estacionaria una matriz de SP Sefarosa Big Beads la cual se empacó a un flujo de 1 mL/min, en una columna cromatográfica XK16 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), hasta obtener un volumen de cama (VC) de 10 mL.

La purificación se llevó a cabo utilizando el esquema cromatográfico propuesto por Fee y Chand (2006). La matriz se equilibró con 5 VC de solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM, pH 6.7 (Solución A). El suero (200-800 mg de proteína total), se aplicó a la columna y se promovió la adsorción de sus proteínas en presencia de la solución A, misma que se utilizó como fase móvil y solución de lavado. Las proteínas débilmente unidas, se eliminaron en un solo paso aumentando la fuerza iónica, de la solución A con NaCl 0.1 M. En seguida, la elución se promovió en presencia de la sal, desarrollando un gradiente de 0.1–1 M de NaCl, utilizando la misma solución amortiguadora. Finalmente, la columna se regeneró lavándola con 5 VC de NaCl 1 M, 2 VC de NaOH 1 M y 10 VC de agua Milli Q para luego volverse a equilibrar con 5 VC la solución A.

El proceso de purificación se monitoreó espectrofotométricamente a 280 nm hasta una densidad óptica (DO) <0.020. A las fracciones obtenidas se les estimó

su concentración proteica a 280 nm y mediante el método de Bradford (1976) a 595 nm, utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA). La purificación de Lf porcina se llevó a cabo de la misma manera pero aplicando entre 900 y 950 mg de proteína total.

IV.4.2 Electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección

La caracterización electroforética de las fracciones de lavado y de elución de la cromatografía de intercambio iónico se realizó en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), según Laemmli (1970). Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%, aplicando a cada pozo 20 µg de proteína. Las masas moleculares de las proteínas separadas se compararon con un estándar de proteína caleidoscópico pre-teñido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los geles se corrieron a 100 V en una cámara Hoeffer Mighty Small 250 (Hoeffer, San Francisco, CA, USA) y se tiñeron con plata (Heukeshoven y Dernik, 1985).

El ensayo de inmunodetección para la identificación de lactoferrina, se llevó a cabo según Towbin *et al.* (1979). Las fracciones de elución de SP Sefarosa Big Beads se separaron mediante SDS-PAGE, como se describió anteriormente y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-Dry blotter 433-2900 (Bluchler Ins., Labconco, USA) por 40 min a 2.5 mA/cm². La presencia de LF se detectó con anti-Lf bovina; se utilizó anti IgG de cabra ligada a peroxidasa como segundo anticuerpo y se promovió el desarrollo de color con 3,3'-Diaminobenzidina.

IV.5 Determinación de la actividad antibacteriana de las lactoferrinas

IV.5.1 Actividad bacteriostática

La actividad bacteriostática se determinó de acuerdo a la metodología propuesta Suzuki *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Se ensayó con Apo y

Holo Lfs bovina y porcina. Para la obtención de la forma Apo, las Lfs obtenidas de la purificación con cromatografía de intercambio iónico se dializaron contra una solución de ácido cítrico 0.1 M durante 48 h, seguida por una diálisis en agua Milli Q durante 48 h (Dionysius *et al.*, 1993). La forma Holo se obtuvo saturando a la molécula con hierro al dializarla contra FeCl_3 60 mM utilizando la metodología propuesta por Schryvers y Morris (1988). El contenido final de hierro de ambas formas, se determinó en porcentaje de saturación, mediante la relación entre las lecturas a 465 nm y 280 nm (465/280), obtenidas en un espectrofotómetro UV-visible (Schryvers y Morris, 1988).

Una vez obtenidas las diferentes formas de Lf de las dos especies, se obtuvo la curva de crecimiento de la *E. coli* K88 en caldo nutritivo para determinar el tiempo requerido para que la bacteria entrara a la fase log. Posteriormente, las diferentes Lfs se añadieron individualmente y por separado en concentraciones de 0.5 y 1 mg/mL a matraces Erlenmeyer con 300 mL caldo nutritivo estéril. Enseguida se inocularon con un cultivo de *E. coli* K88 en fase log, se incubaron a 37°C con agitación y el crecimiento bacteriano se monitoreó cada 30 min utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm (Suzuki *et al.*, 1989). Cada uno de los tratamientos se ensayó por duplicado, utilizando como control a las bacterias inoculadas en caldo nutritivo en presencia de agua bidestilada estéril en vez de Lf.

IV.5.2 Actividad bactericida

Para la actividad bactericida se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) según Hancock (1999), con ligeras modificaciones. Se adicionaron 5 μL de un cultivo de *E. coli* K88 en fase log a placas de ELISA estériles de 96 pozos. La concentración de bacterias en cada pozo, estimada espectrofotométricamente, fue de aproximadamente 10^6 UFC/mL. En seguida, se añadieron a los pozos 100 μL de medio (peptona al 1% o caldo nutritivo) y diferentes concentraciones de Lf bovina o Lf porcina (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 y 4 mg/mL). Las placas se taparon, se incubaron a 37 °C durante 20 h y transcurrido

este tiempo, se leyeron a 595 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad, CA, EUA). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se consideró como la CMI a la concentración más baja a la que la Lf pudo causar una inhibición completa del crecimiento, según la lectura del espectrofotómetro. Después de transcurrido el tiempo necesario para la inhibición, se realizó una siembra en placa utilizando agar cuenta estándar para comprobar dicha inhibición. Este experimento se realizó por triplicado.

IV.6 Interacción *in vitro* de las lactoferrinas con *E. coli* K88

IV.6.1 Cultivo y biotinyilación de bacterias

La cepa de *E. coli* K88 fue donada por el Dr. Carlos Eslava (UNAM) a través de la Dra. Evelia Acedo Félix. Las bacterias se sembraron en caldo nutritivo y se incubaron durante 16 h a 37 °C en una incubadora con agitación Lab-line Instruments (Melrose Park, Ill, EUA). Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 *g* y se lavaron tres veces con solución balanceada de Hanks. Para la biotinyilación, se ajustó la concentración de bacterias a aproximadamente 2×10^9 UFC/mL utilizando un nefelómetro de McFarland (Ruhl *et al.*, 1996).

Las bacterias se biotinyilaron según Ruhl *et al.* (1996) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 0.9 mL de bacterias en solución de Hanks con 0.1 mL de dimetilsulfóxido conteniendo 0.2 mg de NHS-LC biotina (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA), en presencia de lactosa (100 mM), para proteger los sitios de unión a la lectina. Las bacterias se incubaron durante 4 h a 25 °C con agitación lenta en la oscuridad y se lavaron 5 veces con solución amortiguadora de Tris A (NaCl 0.15 M, Tris HCl 20 mM), pH 7.8 para eliminar la biotina que no reaccionó. Por último, se ajustó el contenido de bacterias a aproximadamente 5×10^8 UFC/mL, las cuales fueron almacenadas en oscuridad y a -40 °C hasta su uso.

IV.6.2 Ensayos de manchas

El ensayo de manchas se realizó inmovilizando a las Lfs en tiras de nitrocelulosa. Como blanco se utilizaron tiras a las que se aplicó Tris A, como control negativo se utilizó BSA y como controles positivos mucina de duodeno de lechón y un neoglicano (BSA-gal(α 1-3)gal, Glicorex, Suecia), el cual es reconocido específicamente por la *E. coli* K88. (Erickson *et al.*, 1994). Todas las proteínas se aplicaron en doble dilución desde 1 μ g hasta 1 ng.

Una vez que las membranas estuvieron secas se procedió a bloquear las interacciones no específicas con Tris A en presencia de 0.05% de Tween 20 (TTBS) pH 7.8, al que se le añadió 4% de leche descremada (Ramos Clamont, 2003). El bloqueo se desarrolló durante toda la noche. Posteriormente las tiras se lavaron 3 veces durante 5 min con TTBS y 1 vez con Tris A. A continuación se pusieron en contacto con 5×10^8 células/mL de bacterias biotiniladas en Tris A, conteniendo CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM. Se incubaron por 16 h a 4 °C y se lavaron con TTBS, a pH 7.8. Por último, se incubaron durante 1 h con avidina-fosfatasa alcalina (1:1000) en Tris A y se volvieron a lavar con TTBS. La interacción se reveló utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitro blue tetrazolio (BCIP/NBT).

Para comprobar la intervención de los oligosacáridos de la Lf en la unión con la bacteria, se realizaron ensayos de manchas donde las Lfs bovina y porcina fueron previamente tratadas con una solución de periodato de sodio 10 mM. Este tratamiento se realizó con el fin de oxidar a los carbohidratos presentes en las lactoferrinas evitando así su interacción con las lectinas bacterianas. Las glicoproteínas se expusieron a la acción del periodato durante 30 min (Meng *et al.*, 1998), se dializaron exhaustivamente contra agua bidestilada, se liofilizaron y posteriormente se solubilizaron en Tris A y se inmovilizaron en las membranas de nitrocelulosa por separado. En una tira aparte se aplicó periodato como control. A continuación se siguió el procedimiento escrito anteriormente.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Purificación de lactoferrina bovina

La estrategia cromatográfica que se siguió para la purificación de la Lf fue la reportada por Fee y Chand (2006), utilizando una matriz de SP Sefarosa Big Beads. A diferencia de estos autores, el suero y el calostro no fueron aplicados directamente a la matriz, sino después de varias filtraciones. La Figura 6 muestra el cromatograma típico, obtenido al promover la adsorción de proteínas, utilizando como fase móvil una solución de fosfatos de sodio 10 mM, pH 6.7 (Solución A).

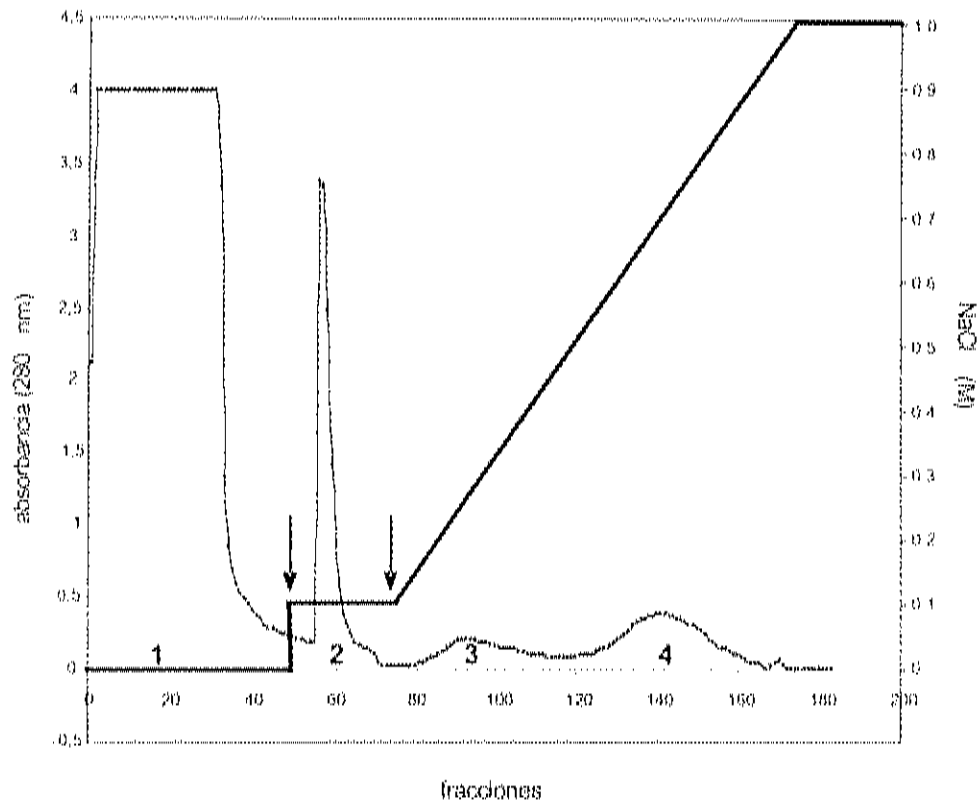


Figura 6. Cromatograma típico de la purificación de lactoferrina bovina por intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads. La adsorción de proteínas se promovió en presencia de solución de fosfatos 10 mM, pH 6.7 (pico 1). Las proteínas adsorbidas se obtuvieron eluyendo con la misma solución pero con NaCl 0.1 M (pico 2) y posteriormente con un gradiente de 0.1-1 M de NaCl (picos 3 y 4).

El pico 1 muestra la fracción de lavado obtenida con 16 VC, los picos restantes son las eluciones de las proteínas adsorbidas. El desprendimiento de las proteínas de la matriz se logró aumentando la fuerza iónica de la solución de lavado (Solución A) con NaCl. Las proteínas que no se adsorbieron específicamente (pico 2), fueron retiradas de la matriz con 7 VC de la solución A conteniendo NaCl 0.1 M. Posteriormente se realizó un gradiente de NaCl de 0.1-1 M en solución A y se obtuvieron otros dos picos de elución (picos 3 y 4). El pico 3 eluyó con 12 VC a una concentración entre 0.1-0.5 M de NaCl a mientras que el pico cuatro se obtuvo entre 0.5-1.0 M de NaCl con 12 VC. Las alturas máximas de los picos 3 y 4 se obtuvieron a 0.24 M y 0.75 M de NaCl, respectivamente. Las cantidades de proteína que se aplicaron y se obtuvieron tanto en el lavado y las eluciones, se muestran más adelante (Tabla 2).

La caracterización de las fracciones cromatográficas se llevó a cabo mediante SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 10% (Laemmli, 1970). La Figura 7 muestra un gel característico, en el carril 1 se aplicaron los estándares de masa molecular y en el 2 el suero de queso entero. Los carriles 3, 4 y 5 muestran las fracciones de lavado, la elución con NaCl 0.1 M y el primer pico (pico 3) que eluyó con el gradiente entre 0.1 y 0.5 M de NaCl, respectivamente. En dichos carriles se observan tres bandas mayoritarias a los 66, 55 y 25 kDa, cuyas masas corresponden a las de la albúmina sérica y a las de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (Igs), respectivamente (Butler, 1983). El carril 6 muestra la fracción del segundo pico de elución (pico 4) con el gradiente entre 0.5 y 1 M. Se observa una banda de 80 kDa correspondiente a la masa molecular de la Lf bovina (Levay y Viljoen, 1995). No se observa contaminación con alguna otra proteína.

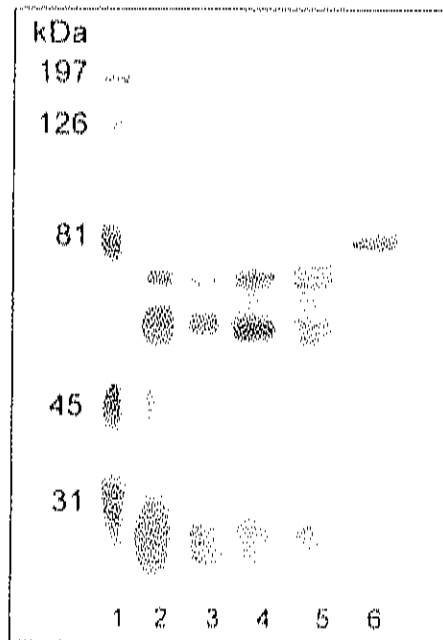


Figura 7. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación de lactoferrina bovina por cromatografía de intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads. (1) Estándar de masa molecular, (2) suero de calostro porcino, (3) lavado con solución de fosfatos 10 mM, pH 6.7, (4) elución con NaCl 0.1 M, (5) pico 3 del gradiente de 0.1-1 M de NaCl, (6) pico 4 del gradiente de 0.1-1 M de NaCl.

Para comprobar que la banda de 80 kDa observada en el carril 6 correspondía a la Lf bovina, se realizó un ensayo de inmunodetección con anti-Lf bovina de acuerdo a Towbin *et al.* (1979). Las fracciones cromatográficas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semiseca. En la Figura 8 se observa que el anticuerpo dirigido contra Lf reconoció a la banda de 80 kDa presente en el suero de queso (carril 2) y del pico 4 (carril 6). En el resto de las eluciones no se observó el reconocimiento del anticuerpo por la Lf. Lo anterior es un indicio de que gran parte de esta glicoproteína sino es que toda, se obtuvo en el segundo pico de elución del gradiente, con la máxima concentración a 0.75 M de NaCl. Aplicando estándares de Lf pura a la misma matriz Fee y Chand (2006) obtuvieron dicha elución a 0.8 M de NaCl. Esta diferencia puede deberse a la influencia de las cargas de otras proteínas presentes en el suero.

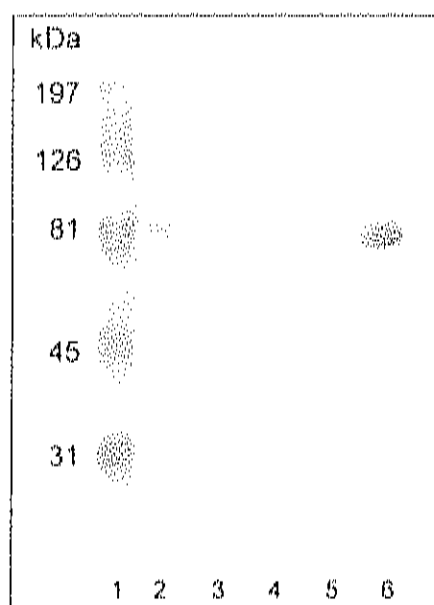


Figura 8. Inmunodetección de lactoferrina bovina en las fracciones de calostro porcino obtenidas por cromatografía de intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads. (1) Estándar de masa molecular, (2) suero de calostro porcino, (3) lavado con solución de fosfatos 10 mM, pH 6.7, (4) elución con NaCl 0.1 M, (5) pico 3 del gradiente de 0.1-1 M de NaCl, (6) pico 4 del gradiente de 0.1-1 M de NaCl.

V.2 Purificación de lactoferrina porcina

La purificación de la Lf porcina se ensayó siguiendo el mismo procedimiento que para la Lf bovina. Previamente se obtuvo el suero a partir de la acidificación del calostro. Posteriormente el suero se ajustó a un pH de 6.8 y se introdujo a la columna SP Sefarosa Big Beads obteniéndose un cromatograma similar al de la purificación de la Lf bovina. El pico 1 muestra la fracción de lavado obtenida con 26 VC, los picos restantes son las eluciones de las proteínas adsorbidas. El desprendimiento de las proteínas de la matriz se logró aumentando la fuerza iónica de la solución A conteniendo NaCl. Las proteínas que no se adsorbieron específicamente (pico 2), fueron retiradas de la matriz con 15 VC de la solución A conteniendo NaCl 0.1 M. Posteriormente se realizó un gradiente de 0.1-1 M de NaCl en solución A y se obtuvieron otros dos picos de elución (picos 3 y 4), los

cuales presentaron las mismas características que en la purificación a partir de suero de queso. El pico 3 eluyó con 12 VC a una concentración entre 0.1-0.5 M de NaCl a mientras que el pico cuatro se obtuvo entre 0.5-1.0 M de NaCl con 12 VC. Las alturas máximas de los picos 3 y 4 se obtuvieron a 0.24 M y 0.75 M de NaCl, respectivamente.

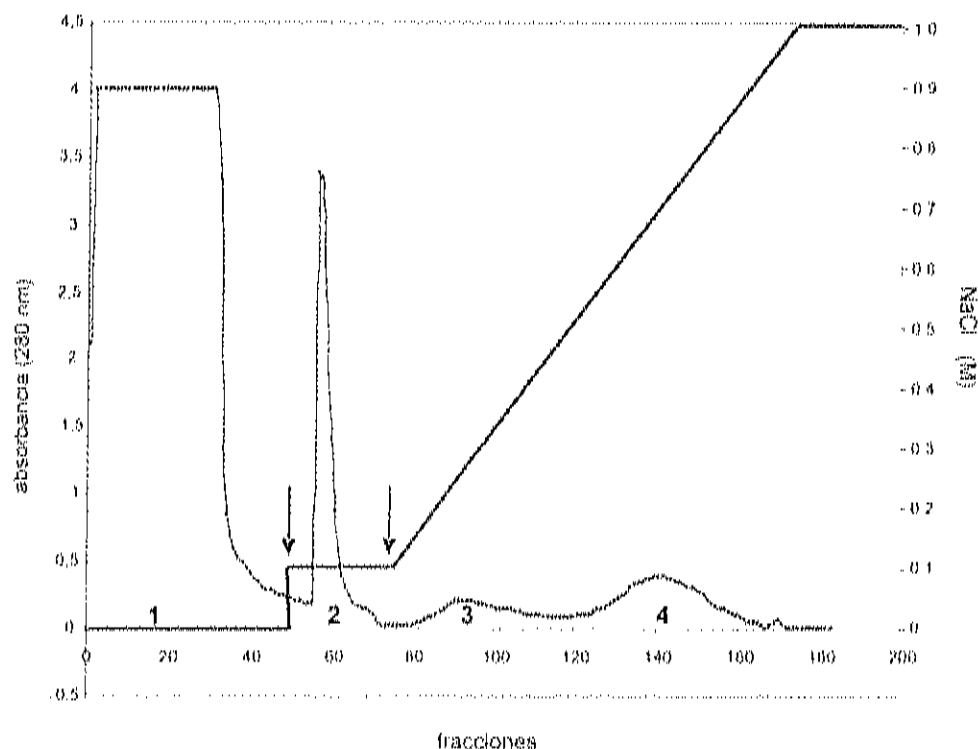


Figura 9. Cromatograma típico de la purificación de lactoferrina porcina por intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads. La adsorción de proteínas se promovió en presencia de solución de fosfatos 10 mM, pH 6.7 (pico 1). Las proteínas adsorbidas se obtuvieron eluyendo con la misma solución pero con NaCl 0.1 M (pico 2) y posteriormente con un gradiente de 0.1-1 M de NaCl (picos 3 y 4).

En la Figura 10 se observa el gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras correspondiente a esta corrida cromatográfica. El patrón electroforético de las fracciones cromatográficas fue similar al de la purificación de la Lf bovina. En los carriles 3, 4 y 5 se observan principalmente las bandas correspondientes a las masas moleculares de las cadenas pesadas y

ligeras de las Igs porcinas (Crawley y Wilkie, 2003). En el carril 6 se observa una sola banda cuyo patrón de migración (alrededor de 80 kDa), corresponde a la Lf porcina (Hurley y Bryson, 1999).

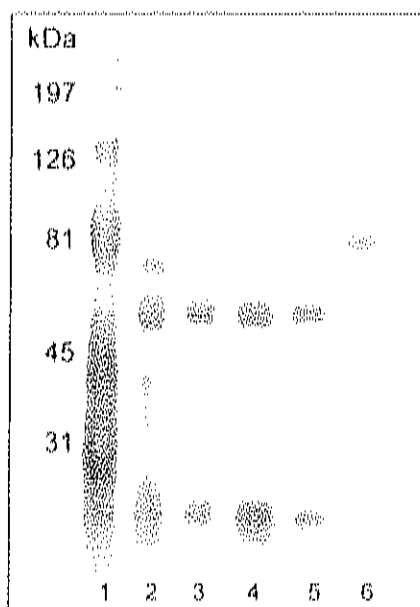


Figura 10. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación de lactoferrina porcina por cromatografía de intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads. (1) Estándar de masa molecular, (2) suero de calostro porcino, (3) lavado con solución de fosfatos 10 mM, pH 6.7, (4) elución con NaCl 0.1 M, (5) pico 3 del gradiente de 0.1-1 M de NaCl, (6) pico 4 del gradiente de 0.1-1 M de NaCl.

Con el fin de confirmar la presencia de lactoferrina porcina, se realizó una transferencia de las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa, seguida de una inmunodetección. En la Figura 11 se observa que la Lf porcina se encuentra presente únicamente en el carril 6 correspondiente al segundo pico del gradiente, lo cual coincide con la purificación de la lactoferrina bovina.

Para la detección de la lactoferrina porcina se utilizó un antisuero policlonal dirigido contra anti-lactoferrina bovina, debido a que no se encontró un anticuerpo comercial dirigido contra la lactoferrina porcina. Como puede observarse en el

carril 1 de la Figura 11, la anti-Lf bovina reconoció a una banda de aproximadamente 55 kDa que puede corresponder al lóbulo N de la Lf o a una reacción cruzada con las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

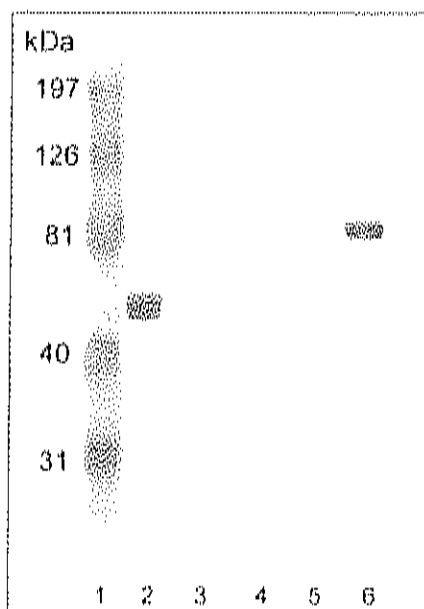


Figura 11. Inmunodetección de lactoferrina porcina en las fracciones de calostro porcino obtenidas por cromatografía de intercambio iónico en SP Sefarosa Big Beads. (1) Estándar de masa molecular, (2) suero de calostro porcino, (3) lavado con solución de fosfatos 10 mM, pH 6.7, (4) elución con NaCl 0.1 M, (5) pico 3 del gradiente de 0.1-1 M de NaCl, (6) pico 4 del gradiente de 0.1-1 M de NaCl.

Debido a que este comportamiento ya se había presentado durante la inmunodetección de lactoferrina porcina obtenida por afinidad con heparina (Datos no mostrados) se cree que el Western blot muestra una reacción cruzada con las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas porcinas A y G cuyas masas moleculares se encuentran entre 52 y 56 kDa (Ramos-Clamont, 2003). Una reacción cruzada puede ocurrir debido a que el antígeno que provoca la reacción cruzada comparte un epítipo en común o uno similar, con el antígeno que se está tratando de detectar.

Con el fin de disminuir posibles interacciones inespecíficas el anticuerpo fue adsorbido utilizando suero de calostro porcino siguiendo la técnica validada por el Laboratorio de Residuos Tóxicos de CIAD. Sin embargo, los resultados fueron los mismos (Figura 11, carril 1). Una posible causa de la reacción cruzada es que las cadenas pesadas de las Igs porcinas compartan cierta homología con alguna región de la Lf. Se sabe que este es el caso de la lactoglobulina bovina la cual comparte una región homóloga con el lóbulo N de la Lf humana, entre los residuos 54-135 de la Lf y los residuos 124-141 de la lactoglobulina (Monti *et al.*, 1989).

En la Tabla 2 se resumen los resultados de la purificación de las Lfs bovina y porcina obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico con SP Sefarosa Big Beads, al aplicar diferentes concentraciones de proteína de suero bovino o de calostro porcino respectivamente. El porcentaje de recuperación de proteína aplicada fue mayor del 98%. Estos datos son similares a los reportados por Doultani *et al.* (2004) para el aislamiento de proteínas de suero de queso.

Hablando específicamente de la Lf, se obtuvo el 0.16% de Lf bovina del total de proteína aplicada; este resultado se encuentra por arriba del reportado por Morison y Joyce (2005) para la extracción de proteínas del suero por cromatografía de intercambio iónico, el cual fue de 0.003% de Lf bovina. Las concentraciones de Lf reportadas para la leche bovina fluctúan entre 0.02 y 0.4 % en vacas sanas en etapa de lactancia (Welly *et al.*, 1976). Otros autores reportan que la concentración en leche puede llegar hasta 0.9 % dependiendo de la etapa de lactancia, de la raza de la vaca y de su estado de salud (Wang y Huyley, 1998; Masson y Heremans 1971). En cuanto a la Lf porcina se obtuvo alrededor de un 3.9% lo cual concuerda por lo reportado por Lønnerdal (1998) que indica que los calostros provenientes de humano y cerdo son los que presentan un mayor contenido de Lf encontrándose en niveles desde 2 a 4%, dependiendo del día de lactancia a partir del parto. Otros factores que influyen sobre el contenido de proteínas con actividad bioactiva son la edad, el número de partos y la camada, así como la raza (Masson y Heremans 1971).

Tabla 2. Cuantificación de la purificación de la lactoferrina de suero de queso bovino y suero de calostro porcino por cromatografía de intercambio iónico.

MUESTRA	PROTEÍNA		1º PICO DE ELUCIÓN	2º PICO DE ELUCIÓN	3º PICO DE ELUCIÓN	RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA APLICADA (%)
	APLICADA (mg)	LAVADO				
mg de proteína total						
SUERO	222.00	203.36	11.64	3.54	0.35	98.60
	801.60	760.53	33.84	9.52	1.25	100.41
CALOSTRO	947.90	901.60	36.00	4.97	37.74	103.41
	953.40	910.70	37.00	5.72	37.52	103.93

En este trabajo, no se determinó la capacidad de la matriz debido a que la columna no logró saturarse con las cantidades de proteína aplicada. Fee y Chand (2006) reportan una capacidad de adsorción de Lf y lactoperoxidasa hasta de 48,6 mg/mL de matriz para estas condiciones. Lo anterior representa una gran ventaja para la purificación de Lf bovina a partir de suero de queso ya que en este tipo de columnas y utilizando solo 10 mL de matriz de VC pueden aplicarse hasta 2 L de suero. En cambio, con otras cromatografías ensayadas durante este estudio como la IMAC y la de afinidad por heparina, se obtenían capacidades máximas de 3 mg de proteína/mL de matriz, con la desventaja de que, durante el proceso, se observaba contaminación con Igs por electroforesis (datos no mostrados).

V.3 Determinación de la actividad antibacteriana de las lactoferrinas

V.3.1 Actividad bacteriostática

La actividad bacteriostática de la lactoferrina se ensayó en caldo nutritivo utilizando el método de Suzuki *et al.* (1989). El crecimiento microbiano se

determinó por turbidimetría a 660 nm utilizando concentraciones de 0.5 y 1 mg/mL de Apo o de Holo-Lf de ambas fuentes. En la Figura 12 se presentan las curvas de crecimiento para *E. coli* K88 en presencia de 0.5 y 1 mg/mL de Apo-Lf porcina la cual retrasó el crecimiento durante las primeras 1.5 y 2.5 h de incubación respectivamente, con respecto al control ($p < 0.05$).

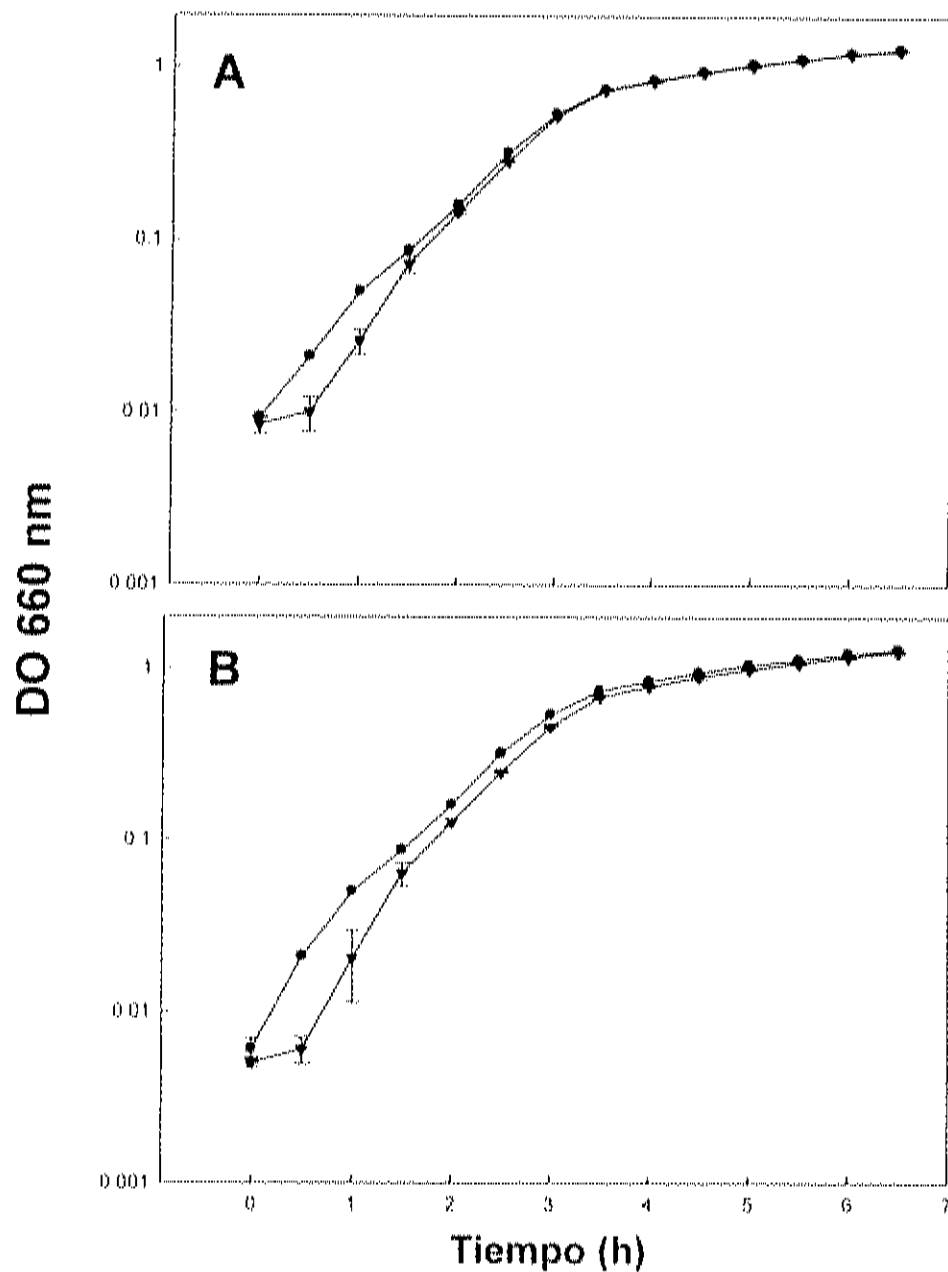


Figura 12. Curvas de crecimiento de *E. coli* K88 en presencia de A, 0.5 mg/mL y B, 1 mg/mL de Apo-Lf porcina (▼), Control (●).

Como se observa en la Figura 13, este efecto fue mayor con la Apo-Lf bovina la cual retardó el crecimiento de la K88 durante las primeras 3 h de incubación al utilizar 0.5 mg/mL y durante las 4.5 h al usar 1 mg/mL. Lo anterior indica que el efecto bacteriostático dependió de la especie y de la concentración.

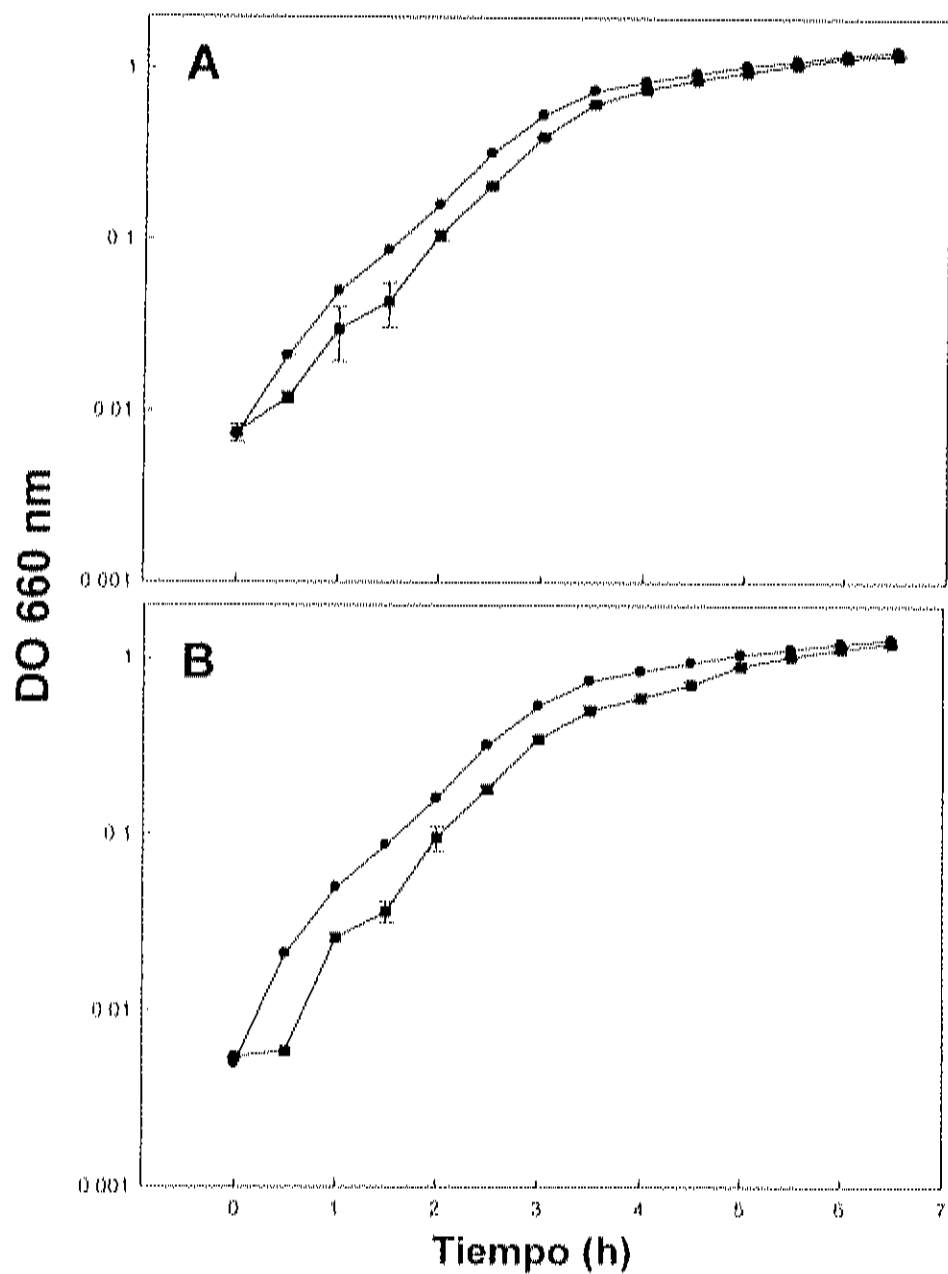


Figura 13. Curvas de crecimiento de *E. coli* K88 en presencia de A, 0.5 mg/mL y B, 1 mg/mL de Apo-Lf bovina (■), Control (●).

No se detectó efecto bacteriostático en presencia de las Holo-Lfs porcina y bovina en ninguna de las concentraciones utilizadas (Figuras 14 y 15). Este comportamiento es normal debido a que, al encontrarse la lactoferrina saturada de hierro, no podrá secuestrar a dicho elemento quedando disponible para las bacterias.

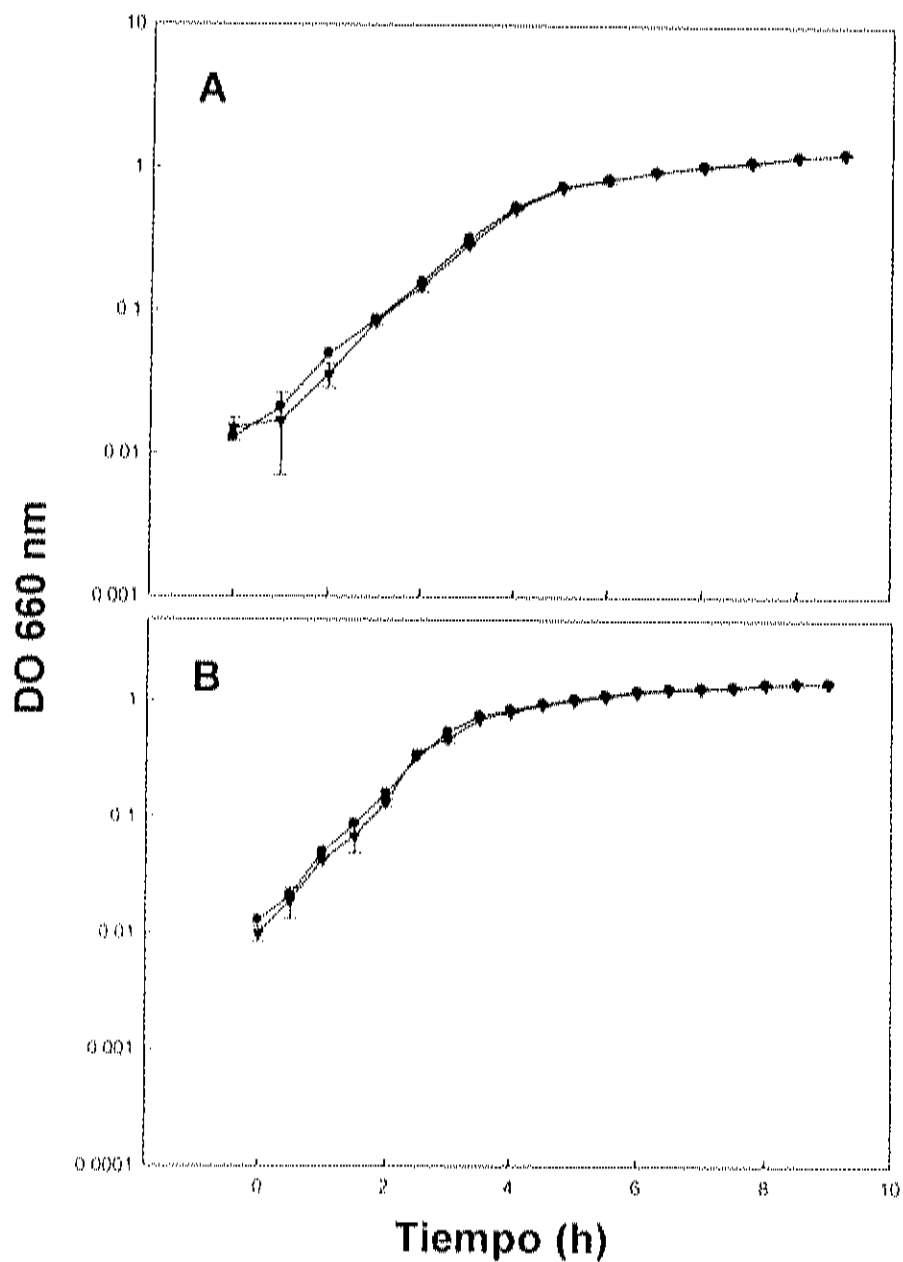


Figura 14. Curvas de crecimiento de *E. coli* K88 en presencia de A, 0.5 mg/mL y B, 1 mg/mL, de Holo-Lf porcina (▼). Control (●).

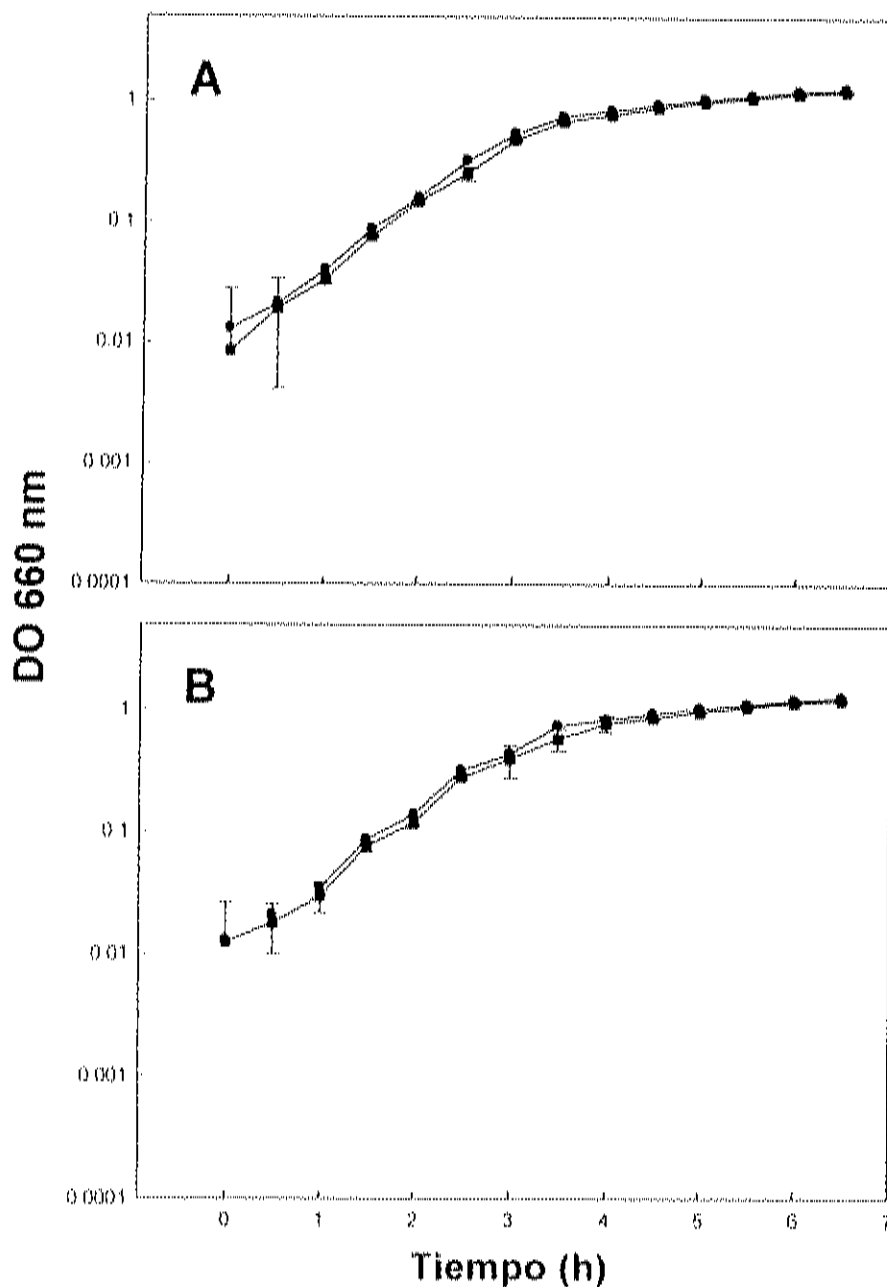


Figura 15. Curva de crecimiento de *E. coli* K88 en presencia de A, 0.5 mg/mL y B, 1 mg/mL de Holo-Lf bovina (■), Control (●).

La función bacteriostática de la lactoferrina se debe a su capacidad para ligar hierro (Ward *et al.*, 2002). La forma Holo de la Lf se encuentra saturada de hierro, es por ello que no ejerce un efecto bacteriostático, en cambio, la forma Apo (libre de hierro) y en la que se encuentra la Lf en las secreciones, tiene la

posibilidad de secuestrar al metal en los sitios de infección; privando a las bacterias de un nutriente esencial para su crecimiento (Bullen *et al.*, 1978; Bezwoda y Mansoor, 1989).

Otros autores han observado el efecto bacteriostático de la Apo-Lf bovina utilizando diferentes cepas de *E. coli*. Dionysius *et al.* (1993) trabajaron con cepas de *E. coli* aisladas de lechones y observaron un efecto bacteriostático de la Apo-Lf bovina durante 6 h después de la incubación y hasta las 16 h. Griffiths *et al.* (2003) concluyeron que el crecimiento de *E. coli* O157:H7 fue menor en presencia de Apo-Lf bovina durante las primeras 4 h de incubación, mientras que Yoshida *et al.* (2000) observaron una disminución marcada en el crecimiento de *E. coli* IFO 3301 en presencia de Apo-Lf bovina durante las primeras horas 2 h. Para comprobar la participación del hierro en la basteriostasis de la Lf Brock *et al.* (1983) realizaron un experimento con *Escherichia coli* NCTC 8623 observando un descenso en su crecimiento durante las primeras 10 h de incubación, en presencia de Apo-Lf. Los investigadores lograron inhibir el efecto bacteriostático añadiendo hierro saturado al cultivo o mediante la adición de la enterobactina (sideróforo enterobacteriano).

Una de las estrategias más comunes de los microorganismos para secuestrar hierro es la producción de sideróforos, pequeñas moléculas solubles que atrapan el hierro de las glicoproteínas, posteriormente son reconocidas por receptores bacterianos y liberadas en el interior de su célula (Ames, 1986; Neilands, 1981).

En *E. coli* se han encontrado dos tipos de sideróforos principalmente; la enterobactina un fenolato cuyo gen se localiza en el cromosoma de *E. coli* y que está presente en la mayoría de las cepas, y la aerobactina, cuyos genes pueden estar localizados en plásmidos o cromosomas y que es producida principalmente por especies patógenas que causan septicemias (Crosa, 1984 y 1989). Los sideróforos presentan gran afinidad por proteínas bacterianas superficiales cuya expresión aumenta durante la infección *in vivo* y el crecimiento *in vitro* (Griffiths *et*

al., 1983; Chart *et al.*, 1988). Lo anterior favorece la disminución del efecto bacteriostático de la Lf después de un periodo de adaptación de la bacteria (Brock *et al.*, 1982).

Existe una considerable variación cuantitativa en la expresión de proteínas superficiales que se unen al hierro secuestrado por los sideróforos, que depende de la cepa de *E. coli* (Griffiths *et al.*, 1983; Chart *et al.*, 1988). Lo anterior explica el porqué la lactoferrina presenta un mayor o un menor efecto bacteriostático en el crecimiento de diferentes cepas de la bacteria. En este experimento se observó un mayor efecto de la Lf bovina que de la Lf porcina.

Una posible explicación es que la lactoferrina presenta varias estrategias para defenderse de los patógenos y en este caso, se ha observado que durante el crecimiento de cultivos para la determinación de la actividad bacteriostática, la Lf empieza a establecer interacciones con la pared bacteriana, iniciando su efecto bactericida (Yamauchi *et al.*, 1993). Se sabe que este efecto se debe a la capacidad del extremo amino terminal de la lactoferrina de interactuar con la pared bacteriana. Esta capacidad depende de la secuencia de aminoácidos y es mayor en la lactoferrina bovina que en la porcina (Baveye *et al.*, 1999; Legrand *et al.*, 1998; Mann *et al.*, 1994).

V.3.2 Actividad bactericida

La actividad bactericida de las Lfs porcina y bovina se ensayó tanto en caldo nutritivo como en peptona al 1%. La Figura 16 sintetiza los resultados encontrados en caldo nutritivo. No se observó efecto bactericida de ninguna de las Lfs, resultado que fue confirmado al sembrar en placas de agar plate count y obtener crecimiento a todas las concentraciones de Lf utilizadas. Sin embargo, se pudo observar una disminución del crecimiento bacteriano, la cual fue evidente al incubar a bacteria en presencia de ambas Lfs a una concentración de 0.125 mg/mL. Además, se pudo apreciar que no hubo una mayor disminución del

crecimiento al incubar con las Lfs a concentraciones entre 0.25 y 1 mg/mL; pero con 2, 3 y 4 mg/mL de Lf bovina se logró disminuir significativamente el crecimiento de *E. coli* K88.

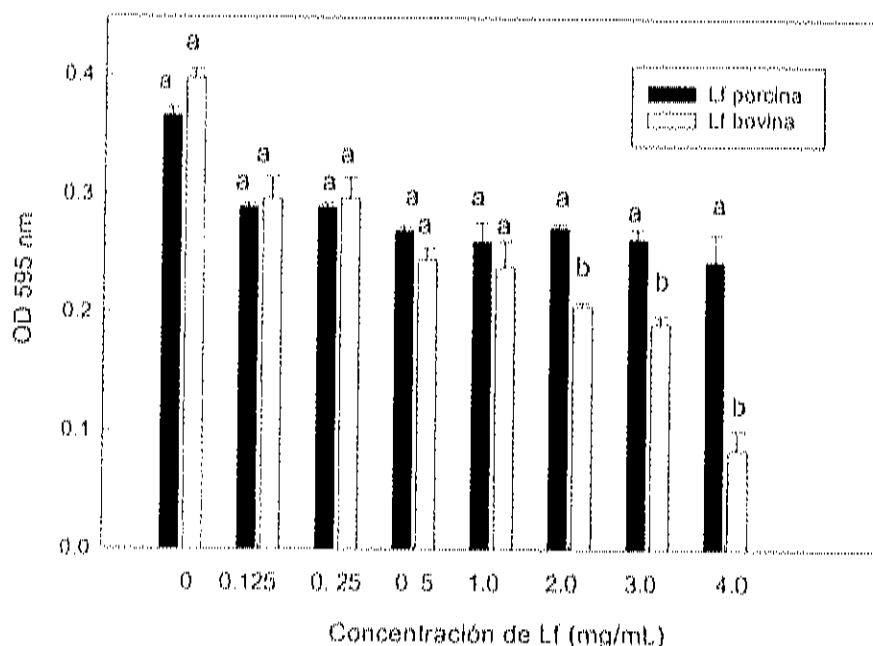


Figura 16. Efecto bactericida las lactoferrinas porcina y bovina sobre *E. coli* K88 cultivada en caldo nutritivo. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$) a una misma concentración.

La Figura 17 presenta el efecto de las Lfs porcina y bovina sobre *E. coli* K88 cultivada en peptona al 1 %. No se observó efecto bactericida de ninguna de las Lfs. Esto se confirmó al hacer una siembra en placa, observando crecimiento en todas ellas. Sin embargo, se observó una disminución del crecimiento microbiano dependiente de la concentración de Lf. La disminución en el crecimiento microbiano provocada por la Lf porcina fue evidente a una concentración de 0.25 mg/mL, mientras que la Lf bovina requirió de la mitad de esta concentración (0.125 mg/mL). A concentraciones de 0.25, 0.50 y 1 mg/mL la Lf porcina presentó un menor efecto ($p < 0.05$) sobre el crecimiento de la K88 que la Lf bovina; mientras que a 2, 3 y 4 mg/mL no se observan diferencias significativas entre estas.

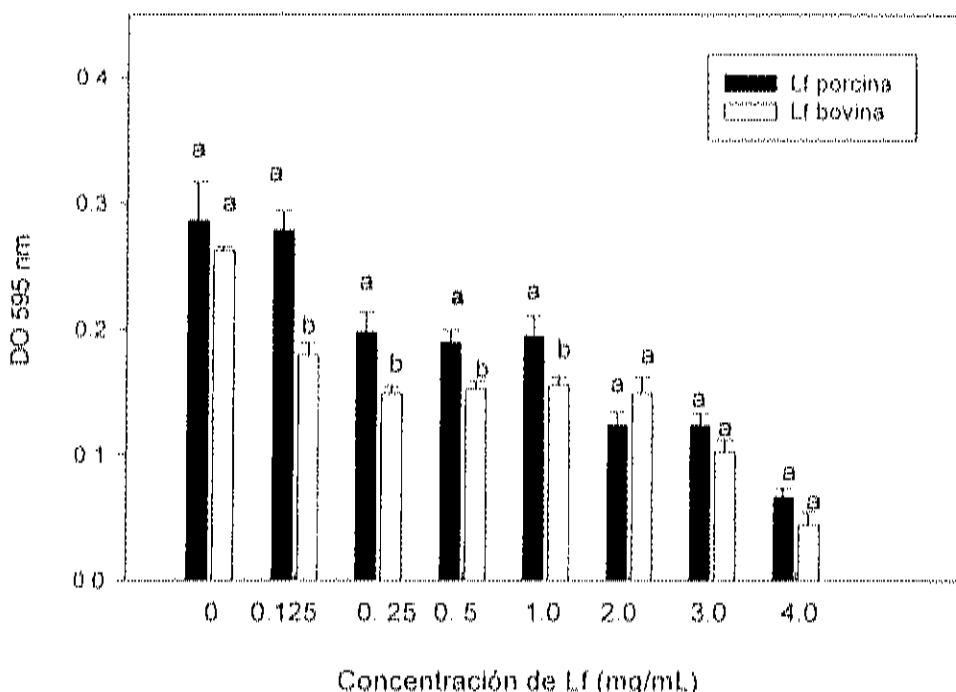


Figura 17. Efecto bactericida de lactoferrinas porcina y bovina sobre *E. coli* K88 cultivada en peptona al 1%. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$) a una misma concentración.

Si se compara el crecimiento de la bacteria en relación con el medio de cultivo utilizado (Figura 18 y 19), se observa que en el caldo nutritivo la bacteria crece más que en peptona al 1 %. Este comportamiento se debe a que el caldo nutritivo cuenta con una mayor cantidad de nutrientes.

Tomita *et al.* (1991 y 1994) reportaron una CMI de 2 mg/mL de Lf bovina para diferentes cepas de *E. coli* en peptona al 1% y en glucosa-peptona-levadura (PYG, por sus siglas en inglés); mientras que Yamauchi *et al.* (1998) encontraron que a una concentración de 3 mg/mL en peptona al 1% era suficiente para inhibir a *E. coli* O157:H7 y al utilizar PYG se requerían 6 mg/mL para lograr esta inhibición. Estos resultados proporcionan una idea de la variabilidad que existe en cuanto a las concentraciones requeridas de Lf para observar un efecto bactericida sobre diferentes cepas de *E. coli*, por lo que probablemente a concentraciones mayores de 4 mg/mL Lf se pudiera observar este efecto sobre *E. coli* K88.

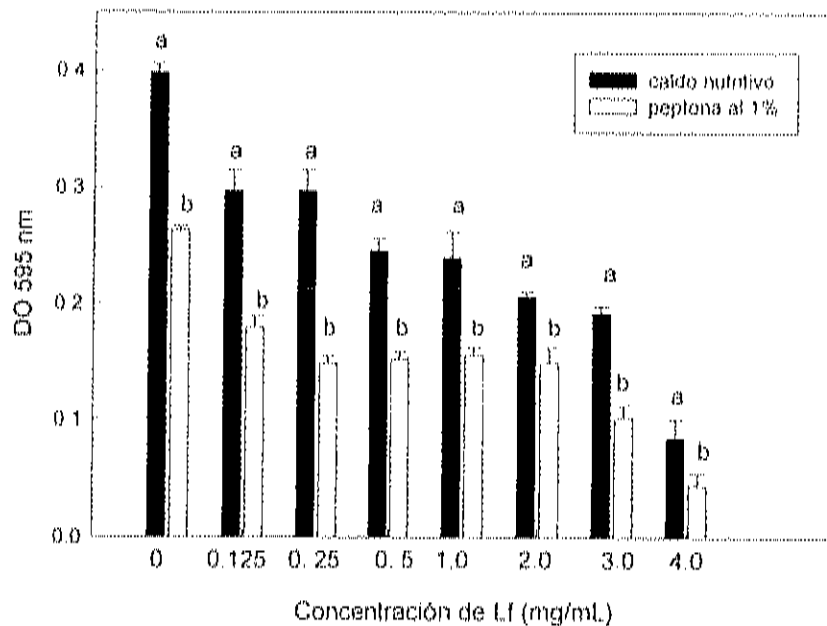


Figura 18. Efecto bactericida de la lactoferrina bovina sobre *E. coli* K88 cultivada en peptona al 1% y caldo nutritivo. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$) a una misma concentración.

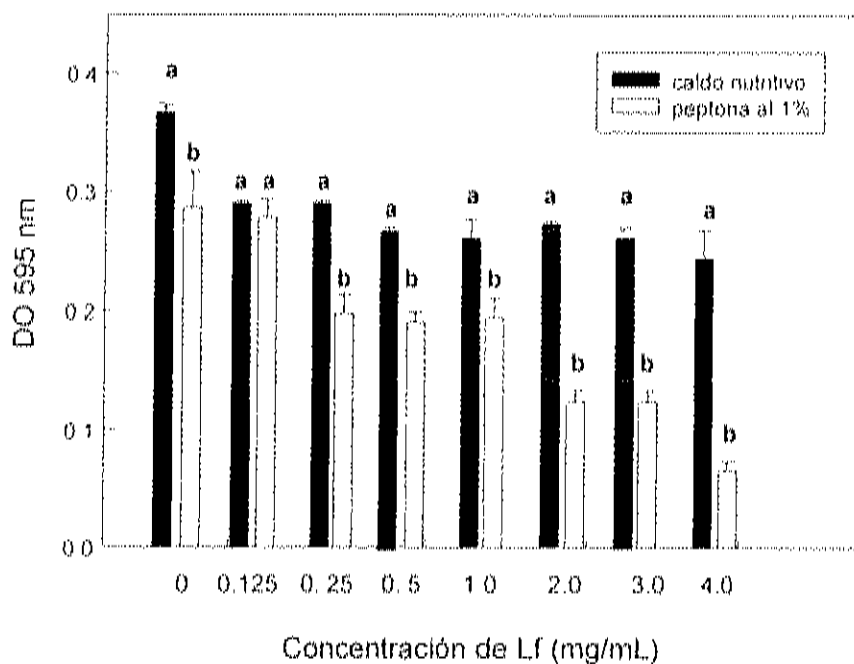


Figura 19. Efecto bactericida de la lactoferrina porcina sobre *E. coli* K88 cultivada en peptona al 1% y caldo nutritivo. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$) a una misma concentración.

V.4 Interacción *in vitro* de las lactoferrinas con *E. coli* K88

La interacción de las lactoferrinas bovina y porcina, se probó mediante ensayos de manchas inmobilizando individualmente, desde 1 µg hasta 1 ng de las dos moléculas, en tiras de nitrocelulosa y poniéndolas en contacto con *E. coli* K88 biotinilada. Esta bacteria es uno de los principales agentes patógenos de lechones neonatos y recién destetados (Carvajal, 2000; Mota, 1998). La Figura 20 indica que el biorreconocimiento entre la Lf bovina y *E. coli* K88 (carril 5) fue mayor que entre la Lf porcina y esta bacteria (carril 7). Se observa que la bacteria interaccionó con la Lf bovina hasta concentraciones de 31.2 ng, mientras que la Lf porcina solo interaccionó hasta una concentración de 250 ng. Lo anterior es un indicio de la mayor actividad de la Lf bovina sobre la bacteria.

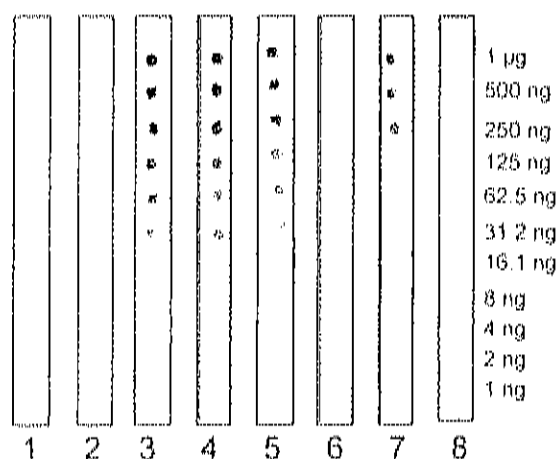


Figura 20. Interacción *in vitro* de las lactoferrinas con *E. coli* K88. 1, TBS (blanco); 2, BSA (control -); 3, BSA Gal (α 1-3) Gal (control +); 4, mucina de duodeno de lechón (control +); 5, Lf bovina; 6, Lf bovina con sus oligosacáridos oxidados; 7, Lf porcina; 8, Lf porcina con sus oligosacáridos oxidados.

En bacterias Gram negativas como *V. cholerae* y *E. coli*, se ha detectado la interacción de la Lf bovina con la superficie bacteriana, seguida de la liberación del LPS, el aumento en la permeabilidad de la membrana y la liberación del contenido citoplasmático de la bacteria (Yamauchi *et al.*, 1993; Ellass-Rochard *et al.*, 1998). Esta interacción está mediada por cargas eléctricas y se establece

entre la Lf, cargada positivamente y el LPS presente en la pared celular, cargado negativamente (Yamauchi *et al.*, 1993). Otro tipo de biorreconocimiento que pudiera presentarse entre la bacteria y la lactoferrina es el de las interacciones proteínas-carbohidrato establecido entre la adhesina de *E. coli* K88 y los oligosacáridos de la Lf. Con el fin de probar si este tipo de interacción ocurre, las Lfs bovina y porcina fueron tratadas previamente con periodato, dializadas exhaustivamente contra agua bidestilada, liofilizadas e inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa.

En los carriles 6 y 8 de la Figura 20 se muestran los ensayos con las Lfs bovina y porcina tratadas con periodato respectivamente. Visualmente no se observó interacción entre las Lfs tratadas y la *E. coli* K88, lo cual sugiere que los carbohidratos de las lactoferrinas están implicados en la unión con la bacteria. Para completar estos estudios es necesario realizar ensayos de cuantificación de las interacciones (por ejemplo, ELISAS) y otros entre lactoferrinas deglicosiladas y la bacteria.

La familia de las transferrinas a la que pertenecen las Lfs, está integrada por una serie de glicoproteínas que se encuentran en el suero, la leche y el huevo. Un estudio comparativo de 27 estructuras oligosacáridas presentes en 19 sero, lacto y ovo transferrinas de diferentes animales, muestra que la composición y tipo de estructura de los carbohidratos depende de la especie (Spik *et al.*, 1998). Por ejemplo, la Lf humana presenta 3 sitios ocupados de N-glicosilación con oligosacáridos del tipo sialil N-acetilactosamina, $\alpha(1-6)$ fucosilados en la N-acetilglucosamina (GlcNac) unida a la asparagina que pueden estar fucosilados o no, por medio de un enlace $\alpha(1-3)$, en una GlcNac externa (Derisbourg *et al.*, 1990). En cambio la Lf bovina presenta de 4 a 5 sitios de N-glicosilación con estructuras altas en manosa y complejas no fucosiladas (Pierce *et al.*, 1991).

Las estructuras oligosacáridas de la Lf bovina han sido muy estudiadas mientras que las de la Lf porcina no. La Lf bovina presenta una N-glicosilación

altamente heterogénea, pero en general se reconoce que en la Asn-233 y la Asn-545 predominan oligosacáridos altos en manosa, mientras que en la Asn-368 y la Asn-476 se pueden encontrar oligosacáridos del tipo altos en manosa o de tipo complejo, dependiendo del periodo de lactación de la vaca (Hutchens *et al.*, 1994). Los estudios de Hutchens *et al.* (1994) indican que existe una mayor proporción de estructuras complejas en la Lf bovina del calostro que en la de la leche. Otros investigadores han observado que en la Lf bovina de calostro el quinto sitio de glicosilación localizado en el lóbulo N en la Asn-281, se encuentra glicosilado en el 30 % de las moléculas de Lf y esta glicosilación disminuye a un 15% de la Lf bovina de la leche (van Veen *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2000). Lo anterior ha llevado a suponer que la síntesis de glicanos de tipo complejo en la Lf bovina del calostro pudiera estar controlada por hormonas en la glándula mamaria (Yoshida *et al.*, 2001).

Se sabe que la Lf porcina cuenta con tres sitios potenciales de N-glicosilación los cuales se han localizado en el lóbulo C-terminal (Asn-366, 472 y 571); los oligosacáridos de dichas estructuras son del tipo complejo biantenarico, aunque solo se han podido detectar en uno solo de los sitios de glicosilación (Montreuil *et al.*, 1997). De acuerdo a la especificidad de la adhesina de la *E. coli* K88, es posible que la interacción entre la Lf bovina o porcina y la bacteria se esté dando con este tipo de N-glicanos complejos. Se han identificado varios posibles receptores para la adhesina de la *E. coli* K88, los cuales pueden ser tanto glicolípidos como glicoproteínas sialiladas o no. Se concluyó que los residuos de galactosa, están involucrados primordialmente en la interacción lectina-receptor. Otros carbohidratos importantes en la unión son la GlcNac y la GalNAc. Las principales secuencias que median la interacción lectina-receptor son Gal β (1-3)GalNAc Fuca(1-2), Gal β (1-3)GlcNAc, Gal α (1-3)Gal, Gal α (1-4)GlcNAc (Erickson *et al.*, 1994).

Tanto la Lf bovina como la Lf porcina presentan estructuras del tipo Gal α (1-4)GlcNAc en sus oligosacáridos complejos que pudieran estar siendo

reconocidas por la adhesina K88. Se ha observado que esta última, reconoce a Gal α (1-4)GlcNAc presentes en la transferrina porcina (Grange *et al.*, 2002) y probablemente en la IgA porcina (Ramos-Clamont, 2003). Una posible explicación de porque existe un mayor reconocimiento entre la adhesina K88 y la Lf bovina es que ésta presenta un mayor número de sitios glicosilados (de cuatro a cinco) que la Lf porcina (uno) (Hurley *et al.*, 1994).

Debido a que los enteropatógenos Gram negativos pueden expresar varios tipos de fimbrias, cabe la posibilidad de que otros oligosacáridos de la Lf bovina hayan sido reconocidos por la fimbria tipo I de *E. coli*. La primera fimbria descrita como factor de adhesión fue la fimbria tipo I que se expresa en muchas cepas de *E. coli*, patogénicas o no. Firon *et al.* (1983), determinaron que la fimbria tipo I se une a receptores celulares que contengan la estructura Man α (1-3)Man β (1-4)GlcNAc como los presentes en las Asn-233 y la Asn-545 de la Lf bovina. Sin embargo, se requiere de realizar ensayos de inhibición de la adhesión de la K88 a la Lf bovina con manosa y galactosa para determinar si ambos tipo de adhesinas reconocen específicamente a los oligosacáridos de la misma.

Un hallazgo importante en este trabajo es que, por lo menos visualmente, los oligosacáridos de la Lf bovina son reconocidos con la misma intensidad que las mucinas de duodeno de lechón, las cuales son receptores naturales de la adhesina K88. Lo anterior es un indicio de que la Lf pudiera competir como receptor de la K88 con las mucinas, previniendo la adhesión de la bacteria a las mucinas. Sin embargo, se requieren estudios de cuantificación de la adhesión y estudios *in vivo* en lechones, para probar a las Lfs. El significado de la glicosilación de la Lf no está completamente entendido y permanece como un tema controversial.

Existen trabajos que indican que estos carbohidratos no intervienen en la función de la glicoproteína y que solo le confieren protección contra la proteólisis (van Veen *et al.*, 2004; van Berkel *et al.*, 1995). Sin embargo, otras investigaciones

indican que los oligosacáridos de la lactoferrina humana son necesarios para su aclaramiento o retiro del organismo (Prieels *et al.*, 1978), o que previene la adhesión de patógenos a su huésped (Teraguchi *et al.*, 1996). En este trabajo se obtuvo evidencia de que los oligosacáridos tanto de la lactoferrina bovina, como de la porcina, pueden ser reconocidos por la fimbria de *E. coli* K 88, queda por ensayar si estos oligosacáridos son capaces de inhibir la adhesión del enteropatógeno tanto a las mucinas como a las células epiteliales del lechón.

Durante la lactancia y el destete los lechones sufren frecuentemente de síndrome infeccioso cuya morbilidad es variable y mortalidad casi nula. Sin embargo, durante estas diarreas se presentan frecuentemente complicaciones debidas a infecciones provocadas por rotavirus o *E. coli* enteropatógenas las cuales aumentan la mortalidad hasta en un 100% (Morrilla, 1991). La resistencia del animal lactante a las enfermedades infecciosas es conferida principalmente mediante dos sistemas: la inmunidad pasiva que la madre transfiere al lechón y la protección que confiere a las mucosas la presencia de la flora normal del lechón entre la que destacan los microorganismos probióticos (Gaskins, 1996; Maxwell y Stewart, 1995; Miller *et al.*, 1975).

En los últimos tiempos la presión para que se disminuya el uso de antibióticos y promotores de crecimiento en la producción animal ha aumentado. Lo anterior se debe tanto al riesgo de la aparición de resistencia en patógenos animales y humanos, como a una demanda creciente de productos más naturales. En esta situación, parece que el camino lógico en la producción animal, sea el de intentar optimizar la capacidad de defensa del animal, especialmente en aquellas situaciones de inmunodepresión o inmunosupresión fisiológicas causadas por factores de manejo, como destetes precoces, efectos ambientales o factores patológicos como infecciones virales y bacterianas (Santomá, 2000). Es por ello que actualmente se estudia el efecto de la administración de inmunidad pasiva a los lechones o el uso de probióticos y/o prebióticos. Otra alternativa es la de administrar aditivos estimuladores de la respuesta inmunitaria y de bloqueadores

de la adhesión de bacterias patógenas a la pared intestinal del cerdo (Santomá, 2000). En este sentido la administración de lactoferrina bovina a los lechones pudiera ser de utilidad.

En este trabajo se encontró que concentraciones de 4 mg/mL (50 μ moles) de lactoferrina bovina disminuyen considerablemente el crecimiento microbiano de la *Escherichia coli* K88, mas no lo inhiben. Se recomiendan estudios posteriores en los que se prueben concentraciones mayores de Lf (las concentraciones en calostro porcino pueden llegar hasta 500 μ moles). También se encontró que los oligosacáridos de la Lf bovina son reconocidos por la adhesina K88. Los hallazgos de este estudio podrán servir para estudios posteriores encaminados al uso de la Lfb como bloqueador de la adhesión de bacterias a la pared intestinal. Dada la tendencia actual en la disminución y eventual prohibición de antibióticos y promotores del crecimiento, la lactoferrina bovina podría utilizarse en conjunto con inmunoglobulinas o probióticos como un profiláctico para las diarreas de cerdos.

VI. CONCLUSIONES

La purificación de las lactoferrinas bovina y porcina fue posible en un solo paso cromatográfico, utilizando la matriz de intercambio iónico SP Sefarosa Big Beads.

A las concentraciones utilizadas, ambas lactoferrinas ejercieron un efecto bacteriostático *in vitro* sobre *E. coli* K88 pero no bactericida. Dicho efecto fue mayor en la Lf bovina que en la porcina.

Se encontró evidencia de que los oligosacáridos presentes en ambas lactoferrinas son reconocidos por la adhesina de *E. coli* K88. Lo cual es un indicio de que la Lf bovina pudiera inhibir la adhesión de la bacteria al tracto gastrointestinal de los lechones.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, S.N., Sun, D., Dale, J.B., and Beachey, E.H. 1988. Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of family *Enterobacteriaceae*. *Nature*. 336:682-684.
- Águila, A., and Brock, J.H. 2001. Lactoferrin: Antimicrobial and diagnostic properties. *Biotecnología Aplicada*. 2:76-83.
- Ames, G.F.L. 1986. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 55:397-425.
- Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rice, D.W., and Baker, E.N. 1989. Structure of human lactoferrin: Crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209:711-734.
- Baveye, S., Ellass, E., Mazurier, J., Spik, G., and Legrand, D. 1999. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37:281-286.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. 1992a. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73:472-479.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M. 1992b. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1121:130-136.
- Bezwoda, W.R. and Mansoor, N. 1989. Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantitation, characterization and iron binding properties. *Biomed. Chromatogr.* 3:121-126.
- Bhimani, R.S., Vendrov, Y., and Furmanski, P. 1999. Influence of lactoferrin feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice. *J. Appl. Microbiol.* 86:135-144.
- Blackberg, L., and Hernell, O. 1980. Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *FEBS Lett.* 109:180-183.
- Borregaard, N. 2001. Antibiotic molecules intracellular. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group. www.els.net. Fecha del último acceso: Abril del 2005.
- Borregaard, N., Løllike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielsen, M.H., and Bainton, D.F. 1993. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.* 51:187-198.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brock, J. H., Pickering, M.G., McDowall, M.C., Deacon, A. G. 1983. Role of Antibody and Enterobactin in Controlling Growth of *Escherichia coli* in Human Milk and Acquisition of Lactoferrin- and Transferrin-Bound Iron by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40(2):453-459.
- Bullen, J.J., Rogers, H.J., and Griffiths, E. 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 80:1-35.

- Burnouf, T. 1995. Chromatography in plasma fraction: benefits and future trends. *J. Chromatogr. B.* 664:3-15.
- Butler, J. 1983. Bovine immunoglobulins: An augmented review. *Vet. Immunol. & Immunopath.* 4:43-152.
- Butler, J.E. 1973. The occurrence of immunoglobulin fragments, two types of lactoferrin and a lactoferrin-IgG2 complex in bovine colostrum and milk whey. *Biochim. Biophys. Acta.* 295(1):341-351.
- Carvajal, V.A. 2000. Problemas entéricos en lechón. *Porcicultura mexicana*. Disponible en: <http://www.porcicultura.com>
- Castro, L. 2003. Perspectivas de la red de bovino en leche 2003. Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura. Disponible en: www.gob.fira.mx.
- Chart, H., Stevenson, P., and Griffith, E. 1988. Iron-regulated outer-membrane proteins of *Escherichia coli* strains associated with enteric or extraintestinal diseases of man and animals. *J. Gen. Microbiol.* 134:1549-1559.
- Chen, P.W., Ho, S.P., Shyu, C.L., and Mao, F.C. 2004. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate on the *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from baby pigs. *Am. J. Vet. Res.* 65(2):131-137.
- Crawley, A., and Wilkie, B. 2003. Porcine isotypes: Function and molecular characteristic. *Vaccine.* 3785:1-12.
- Crosa, J. H. 1984. The relationship of plasmid mediated iron transport and bacterial virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 69-89.
- Cunningham, G.A., Headon, D.R., and Conneely, O.M. 1992. Structural organization of the mouse lactoferrin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:1725-1731.
- de Lillo, A., Cernuda, R., and Brock, J.H. 1998. Interaction of lactoferrin with *Micrococcus spp.* and its role in antimicrobial activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443:221-228.
- Debbabi, H., Dubarry, M., Rautureau, M., and Tome, D. 1998. Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J. Dairy Res.* 65:283-293.
- Derisbourg, P., Wieruszeski, J.M., Montreuil, J and Spik, G. 1990. Primary structure of glycans isolated from human leucocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues questions the proposed mechanism of hyposideraemia. *Biochem. J.* 269:821-825.
- Di Mario, F., *et al.* 2003. Use of lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication: preliminary results. *J Clin. Gastroenterol.* 36(5):396-398.
- Dial, E.J., and Lichtenberger, L.M. 2002. Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. *Biochem. Cell Biol.* 80:113-117.
- Dionysius, D.A., Grieve, P.A., and Milne, J.M. 1993. Forms of lactoferrin: Their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 76:2597-2606.
- Doullani, S., Turhan, K.N., and Etzel, M.R. 2004. Fractionation of proteins from whey using cation Exchange chromatography. *Process Biochem.* 39:1737-1743.
- Doyle, M.E. 2001. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. *FRI Briefing.* April:1.

- Ellass-Rochard, E., Legrand, D., Salmon, V., Roseanu, A., Trif, M., Tobias, P.S., Mazurier, J., and Spik, G. 1998. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 66:486-491.
- Elliot, J.I., Senft, B., Erhardt, G., and Fraser, D. 1984. Isolation of lactoferrina and its concentration in sows' colostrum and milk during a 21-day lactation. *J. Animal Sci.* 59(4):1080-1084.
- Erickson, A.K., Baker, D.R., Bosworth, B.T., Casey, T.A., Benfield, D.A., and Francis, D.H. 2003. Characterization of porcine intestinal receptor for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins. *Infect. Immun.* 62:5404-5410.
- Fee, C., and Chand, A. 2006. Capture of lactoferrina and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography. *Sep. Purific. Technol.* 48:143-149.
- Firon, N., Okef, I., and Sharon, N. 1983. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105:1426-1432.
- Gaskins, H.R. 1996. En: *Gastrointestinal Microbial Ecology. Vol 2. Gastrointestinal microbiology and host interactions.* Eds.: Mackie, R.I., Isaacson, R.E., and White, B.A. Chapman and Hall. New York.
- Giampapa, C.S., Abraham, S. N., Chiang, T. M. and Beachey, E. H. 1988. Isolation and characterization of a receptor for type 1 fimbriae of *Escherichia coli* from guinea pig erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 263:5362-5367.
- Grange, P.A., Mouricout, M.A., Lavery, S.V., Francis, D.H., and Erickson, A.K. 2002. Evaluation of receptor binding specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial adhesin variants using porcine serum transferrin and glycosphingolipids as model receptors. *Infect. Immun.* 70:2336-2343.
- Griffiths, E., Duffy, L.C., and Schanbacher, F.L. 2003. *In vitro* growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin. *Digestive Dis. and Sci.* 48(7):1324-1332.
- Griffiths, E., Stevenson, P., and Joyce, P. 1983. Pathogenic *Escherichia coli* express new outer membrane proteins when growing *in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.* 16:95-99.
- Hancock, R.E.W. 1999. Hancock laboratory methods. Disponible en: <http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/methods.php>
- Hennart, P.F., Basseur, D.J., Delogne, J.B., Desnoeck, M., Dramaix, M., and Robyn, C.E. 1991. Lysozyme, lactoferrin, and secretory immunoglobulin A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status, and parity of mother. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:32-39.
- Hirai, Y., Kawakata, N., Satoh, K., Ikeda, Y., Hisayasu, S., Orimo, H., and Yoshino, Y. 1990. Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 36:531-544.
- Hog, A., and Torres, A. 1997. Enteric diseases of swine. University of Nebraska. Report. G85-747-A.

- Huffman, L., and Harper, W. 1999. Maximizing the value of milk through separation technologies. Symposium: Marketing dairy value through technology. *J. Dairy Sci.* 82:2238-2244.
- Hurley, W., and Bryson, J. 1999. Enhancing sow productivity through an understanding of mammary gland biology and lactation physiology. *Pigs New Inf.* 4:125N-130N.
- Hutchens, T. W., Rumball, S.V., and Lönnerdal, B. 1994. Lactoferrin: Structure and function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 357:21-32.
- Hutchens, T.W., Magnuson, J.S., and Yip, T.T. 1989. Interaction of human lactoferrin with DNA: One-step purification by affinity chromatography on single-stranded DNA-agarose. *Pediatr. Res.* 26:618-622.
- Iigo, M., Kuhara, T., Ushida, Y., Sekine, K., Moore, M., and Tsuda, A. 1999. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clin. Exp. Metastasis.* 17:35-40.
- Ishii, K., Takamura, N., Ikehara, T., Nishio, Y., Nagai, H., Kawafune, H., and Sumino, S. 2000. Effect of short-term lactoferrin for patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 32:444-448.
- Johnston, J.J., Rintels, P., Chung, J., Sather, J., Benz, E.J., Jr., and Berliner, N. 1992. Lactoferrin gene promoter: structural integrity and nonexpression in HL60 cells. *Blood.* 79:2998-3006.
- Kawaguchi, S., Hayashi, T., Masano, H., Okuyama, K., Suzuki, T., and Kawase, K. 1989. Effect of lactoferrin-enriched infant formula on low birth weight infants. *Shuusankigaku.* 19:125-130.
- Kunz, C., and Rudloff, S. 1993. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr.* 82:903-912.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Law, B.A., and Reiter, B. 1977. The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey. *J. Dairy Res.* 44:595-599.
- Lee, T.H., Shimazaki, K., Yu, S.L., Nam, M.S., Kim, S.J., Lee, K.K., and Yu, D.Y. 1997. Polymorphic sequence of Korean Native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial activity. *Anim. Genet.* 28:367-369.
- Legrand, D., van Berkel, P.H., Salmon, V., van Veen, H.A., Slomianny, M.C., Nuijens, J.H., and Spik, G. 1998. Role of the first N-terminal basic cluster of human lactoferrin (R2R3R4R5) in the interactions with the Jurkat human lymphoblastic T-cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443:49-55.
- Levay, P.F., and Viljoen, M. 1995. Lactoferrin: a general review. *Acta Haematol.* 80:252-267.
- Lewis, L.A., Rohde, K., Gipson, M., Behrens, B., Gray, E., Toth, S.I., Roe, B.A. and Dyer, D.W. 1998. Identification and molecular analysis of LbpBa, which encodes the two-component meningococcal lactoferrin receptor. *Infect. Immun.* 66:3017-3023.
- Liu, Y.H., and Teng, C.T. 1991. Characterization of estrogenresponsive mouse lactoferrin promoter. *J. Biol. Chem.* 266:21880-21885.
- Lomonte, B. 2003. Nociones de Inmunología. 3ª Edición. http://www.micro.ucr.ac.cr/2003_Nociones_Inmunologia_web.pdf

- Longhi, C., Conte, M.P., Seganti, L., Polidoro, M., Afsen, A., and Valenti, P. 1993. Influence of lactoferrin on the entry process of *Escherichia coli* HB101 (pRI203) in HeLa cells. *Med. Microbiol.* 182:25-35.
- Lönnnerdal, B., and Iyer, S. 1995. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu. Rev. Nutr.* 15:93-110.
- Lydon, J., O'Malley, B.R., Saucedo, O., Lee, T., Headon, D.R., and Conneely, O.M. 1992. Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin. *Bioch. Bioph. Acta.* 1132:97-99.
- Majertle, A., Kidric, J., and Jerala, R. 2003. Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:1159-1165.
- Mann, D.M., Romm, E., and Migliorini, M. 1994. Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *J. Biol. Chem.* 269:23661-23667.
- Marra, M.N., Wilde, C.G., Griffiths, J.E., Snable, J.L., and Scott, R.W. 1990. Bactericidal/permeability increasing protein has endotoxin-neutralizing activity. *J. Immunol.* 144:662-666.
- Masson, P.L., and Heremans, J.F. 1971. Lactoferrin in milk of different species. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 39:119-129.
- Maxwell, F.J. and Stewart, C.S. 1995. En: *The Neonatal Pig: Development and Survival*. Ed.: Varley, M.A. CAB International, Wallingford, UK. pp:155-186.
- Miller, I., Cerna, J., Travnicek, J., Rejnek, J., and Kruml, J. 1975. The role of immune pig colostrum, serum and immunoglobulins IgG, IgM, and IgA, in local intestinal immunity against enterotoxigenic strain of *Escherichia coli* O55 in germfree piglets. *Folia Microbiol (Praha).* 20(5):433-438.
- Monti, J.C., Mermoud A.F., and Jollis, P. 1989. Anti-bovine fl-lactoglobulin antibodies react with a human lactoferrin fragment and bovine fl-lactoglobulin present in human milk. *Cell. Mol. Life Sci.* 45:178-180.
- Montreuil, J., Spik, G., and Mazurier, J. 1997. Transferrin superfamily. *In: Glycoproteins II*. Montreuil, *et al.* Chapter 10:203-239.
- Morrilla, A. 1991. Control inmunológico de la diarrea en cerdos lactantes. *Ciencia Veterinaria.* 5:89-118.
- Naidu, A.S., Tulpinski, J., Gustilo, K., Knowles, J.R., Tips, P.D., and Nimmagudda, R. 2003. Activated lactoferrin: A natural antimicrobial intervention for beef safety. *Proc. Internat. Cong. Meat Sci. Tech.* 49:279.
- Nakajima, M. 1999. Oral administration of lactoferrin enhances the production of IFN- γ and IL-10 in spleen cells cultured with concanavalin A or lipopolysaccharide. *Biomed. Res.* 20:27-33.
- Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50:715-731.
- Newburg, J. 2000. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30:S8-S17.
- Nibbering, P.H., Ravensbergen, E., Welling, M.M., van Berkel, L.A., van Berkel, P.H.C., Pauwels, E.K.J., and Nuijens, J.H. 2001. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect. Immun.* 69(3):1469-1476.

- Ofek, I., and Beachey, E.H. 1979. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. *In: Bacterial adherence, receptors and recognition*. Series B. Vol. 6. pp:3-29.
- Pakkanen, R., and Aalto, J. 1997. Review paper: Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrums. *Int. Dairy J.*, 7:285-297.
- Panella, T.J., Liu, Y.H., Huang, A.T., and Teng, C.T. 1991. Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic-cells, and breast-cancer. *Cancer Res.* 51:3037-3043.
- Pierce, A., Colavizza, D., and Benaissa, M. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 196:177-184.
- Prieels, J.P., Plizzo, S.V., Glasgow, L.R., Paulson, J.C., and Hill, R.L. 1978. Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides containing fucosyl α 1-3 N-acetylglucosamine linkages (fucose/lactoferrin/glycoprotein/lectin). *Biochemistry.* 75(5):2215-2219.
- Qiu, J., Hendrixson, D.R., Baker, E.N., Murphy, T.F., Geme, J.W. St. III, and Plaut, A.G. 1998. Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:12641-12646.
- Rado, T.A., Wei, X.P., and Benz, E.J., Jr. 1987. Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. *Blood.* 70:989-993.
- Ramos-Clamont, M.G. 2003. Aislamiento y purificación de inmunoglobulinas séricas porcinas, caracterización parcial de sus estructuras oligosacáridas y de la adhesión *in vitro* a enteropatógenos del cerdo. Tesis Doctorado CIAD. Hermosillo, Sonora, México.
- Recio, I., and Visser, S. 2000. Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: A comparative study. *Int. Dairy J.* 10:597-605.
- Reiter, B. 1985. The biological significance of the non-immunoglobulin protective proteins in milk. *Dev. Dairy Chem.* 3:281-336.
- Reiter, B., Brock, I.H., and Steel, E.D. 1975. Inhibition of *Escherichia coli* by bovine colostrums and post-colostral milk. II. The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum susceptible and serum resistant strain of *E. coli*. *Immunology.* 28:83-95.
- Riechitel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seydel, U., and Di Padova, F. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8:217-25.
- Roberts, A.K., Chierici, R., and Sawatzki, G. 1992. Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the infant faecal flora. *Acta Paediatr.* 81:119-124.
- Ruhl, S., Sandberg, A.L., Cole, M.F., and Cisar, J.O. 1996. Recognition of Immunoglobulin A by oral Actinomyces and Streptococcal lectins. *Infect. Immun.* 64:5421-5424.
- Santomá, G. 2000. Estimuladores de la inmunidad. XIV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. pp:1-28.

- Sarelli, L., Heinonen, M., Johansson, T., Heinonen, K., and Saloniemi, H. 2003. Lactoferrin in prevention of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in weaned pigs. *J. Applied Res. in Vet. Med.* 2(1):303-310.
- Schryvers, A.B., Bonnaah, R., Yu, R.H., Wong, H., and Retzer, M. 1998. Bacterial lactoferrin receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443:123-133.
- Scopes, R.K. 1993. *Protein purification: principles and practice*. Third Edition. Springer, New York.
- Seyfert, H.M., Tuckoricz, A., Interthal, H., Koczan, D., and Hobom, G. 1994. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter. *Gene*. 143:265-269.
- Shin, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Tomita, M., Otsuka, Y. and Yamazaki, S. 1998. Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:407-411.
- Shirsat, N.V., Bittenbender, S., Kreider, B.L., and Rovera, G. 1992. Structure of the murine lactotransferrin gene is similar to the structure of other transferrin-encoding genes and shares a putative regulatory region with the murine myeloperoxidase gene. *Gene*. 110:229-233.
- Skoog, D.A., and Leary, J.J. 1992. *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College Publishing, Orlando, Florida.
- Spik, G., Coddeville, B., and Montreuil, J. 1988. Comparative study of the primary structures of sero, lacto- and ovo-transferrin glycans from different species. *Biochimie*. 70(11):1459-1469.
- Spik, G., Renner, B., and Sawatzki, G. 1993. Binding properties of different lactotransferrins to human lactotransferrin receptor. *In: New perspectives in infant nutrition, symposium Antwerp*. pp:77-83.
- Suzuki, T., Yamauchi, K., Kawase, K., Tomita, M., Kiyosawa, I., and Okonogi, S. 1989. Collaborative bacteriostatic activity of bovine lactoferrin with lysozyme against *Escherichia coli* O111. *Agric. Biol. Chem.* 53:1705-1706.
- Swart, P.J., Harmsen, M.C., Kuipers, M.E., van Dijk, A.A., van der Strate, B.W.A., van Berkel, P.H.C., Nuijens, J.H., Smit, C., Wiltvrouw, M., De Clercq, E., De Béthune, M.P., Pauwels, R., and Meijer, D.K.F. 1999. Charge modification of plasma and milk proteins in antiviral active compounds. *J. Pept. Sci.* 5:563-576.
- Swart, P.J., Kuipers, M.E., Smit, C., De Clercq, E., Huisman, H., and Meijer, D.K.F. 1996. Antiviral effects of milk proteins: acylation results in polyanionic compounds with portent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 *in vitro*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 12:769-775.
- Tanaka, K., Ikeda, M., Nozaki, A., Kato, N., Tsuda, H., Saito, S., and Sekihara, H. 1999. Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: A pilot study. *J. Cancer Res.* 90:367-371.
- Teng, C.T. 2002. Lactoferrin gene expression and regulation: An overview. *Biochem. Cell Biol.* 80:7-16.
- Teng, C.T., Pentecost, B.T., Marshall, A., Solomon, A., Bowman, B.H., Lalley, P.A., and Naylor, S.L. 1987. Assignment of the lactotransferrin gene to human chromosome 3 and to mouse chromosome 9. *Somatic Cell Mol. Genet.* 13:689-693.

- Teraguchi, S., Shin, K., Fukuwatari, Y., and Shimamura, S. 1996. Glycans of bovine lactoferrin function as receptors for the type 1 fimbrial lectin of *E. coli*. *Infect. Immun.* 64:1075-1077.
- Thulin, A.J. 1989. Manejo y nutrición de cerdos recién destetados para un comportamiento óptimo. *Síntesis Porcina.* 6:8-9.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., and Kawase, K. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74:4137-4142.
- Tomita, M., Takase, M., Bellamy, W., and Shimamura, S. 1994. A review: The active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatr. Jpn.* 36:585-591.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., and Hayasawa, H. 2002. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell Biol.* 80:109-112.
- Torres, A.R., Peterson, E.A., Evans, W.H., Mage, M.G., and Wilson, S.M. 1979. Fractionation of granule proteins of granulocytes by copper chelate chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.* 576:385-392.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.
- Troost, F.J., Saris, M., and Brummer, R-J.M. 2002. Orally ingested human lactoferrin is digested and secreted in the upper gastrointestinal tract *in vivo* in women with ileostomies. *J. Nutr.* 78:2597-2600.
- Trumpler, U.P., Straub, W., and Rosenmund, A. 1989. Antibacterial prophylaxis with lactoferrin in neutropaenic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8:310-318.
- USDA, 1992. National swine survey: morbidity/mortality and health management of swine in the United States. USDA: APHIS: VS: National Animal Health Monitoring System. Fort Collins, Colorado, USA.
- Ultrera, T.U. 2003. Papel de la estabilización de la inmunidad del plantel de cría en el control de las enfermedades del cerdo. *Porcicultura.* Disponible en: <http://www.porcicultura.com>
- van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E.J., van Veen, H.A., Kooiman, P.M., Pieper, F., de Boer, H.A., and Nuijens, J.H. 1995. Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins can both bind iron and have identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibility towards tryptic proteolysis. *Biochem. J.* 312:107-114.
- van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E.J., van Veen, H.A., Mericskay, M., de Boer, H.A., and Nuijens, J.H. 1997. N-terminal stretch arg2, arg3, arg4 and arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem. J.* 328:145-151.
- van der Strate, B.W.A., Harmsen, M.C., The, T.H., Sprenger, H.G., De Vries, H., Eikelboom, M.C., Kuipers, M.E., Meijer, D.K.F., and Swart, P.J. 1999. Plasma lactoferrin levels are decreased in end-stage AIDS patients. *Viral Immunol.* 12:197-203.

- van Veen, H.A., Geerts, M.E.J., van Berkel, P.H.C., and Nuijens, J.H. 2004. The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 271:678-684.
- Vogel, H., Schibli, D.J., Jing, W., Lohmeier-Vogel, E.M., Epand, R.F., and Epand, R.M. 2002. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine- containing peptides. *Biochem. Cell Biol.* 80:49-63.
- Vorland, L. 1999. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *Apms* 107:971-981.
- Wakabayashi, W., Yamauchi, K., and Takase, M. 2006. Lactoferrin research, technology and applications. I. *Dairy J.* 16:1241-1251.
- Wang, C., Chan, W., and Kloer, H.U. 1984. Comparative studies on the chemical and immunochemical properties of human milk, human pancreatic juice and bovine milk lactoferrin. *Comp. Biochem. and Physiol.* 78B:575-580.
- Wang, H., Hurley, W.L. 1998. Identification of lactoferrin complexes in bovine mammary secretions during mammary gland involution. *J. Dairy Sci.* 81:1896-1903.
- Wang, W.P., Iigo, M., Sato, J., Sekine, K., Adachi I., and Tsuda, H. 2000. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn J. Cancer Res.* 91(10):1022-1027.
- Ward, P., Uribe-Luna, S., and Conneely, O. 2002. Lactoferrin and host defense. *Biochem. Cell Biol.* 80:95-102.
- Watanabe, T., Nagura, H., Watanabe, K., and Brown, W.R. 1994. The binding of human milk lactoferrin to immunoglobulin A. *FEBS Lett.* 26(2):203-207.
- Wei, Z., Nishimura, T., and Yoshida, S. 2000. Presence of a glycan at a potential N-glycosylation site, Asn-281, of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 83:683-689.
- Wei, Z., Nishimura, T., and Yoshida, S. 2001. Characterization of glycans in a lactoferrin isoform, lactoferrin-a. *J. Dairy Sci.* 84:2584-2590.
- Welty, F.K., Smith, K.L., and Scharbacher, F.L. 1976. Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 59:224-231.
- Wold, A., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T., and Svanborg Edén, C. 1990. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.* 58:3073-3077.
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T., and Ellison III, R. 1993. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect. Immun.* 61(2):719-728.
- Yoshida, S., and Xiuyun, Y. 1991. Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboximethyl cation exchange chromatography. *J. Dairy Sci.* 74:1439-1444.
- Yoshida, S., Wei, Z., Shinmura, Y., and Fukunaga, N. 2000. Separation of lactoferrin-a and -b from bovine colostrum. *J. Dairy Sci.* 83:2211-2215.
- Zagulski, T., Lipinski, P., Zagulska, A., and Jarzabek, Z. 1998. Antibacterial system generated by lactoferrin in mice *in vivo* is primarily a killing system. *Int J. Exp. Pathol.* 79:117-123.
- Zhang, G.H., Mann, D.M., and Tsai, C.M. 1999. Neutralization of endotoxin *in vitro* and *in vivo* by a human lactoferrin-derived peptide. *Infect. Immun.* 67:1353-1358.

- Zimecki, M., Wlaszczyk, A., Cheneau, P., Brunel, A.S., Mazurier, J., Spik, G., and Kubler, A. 1998. Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. *Arch. Immun. Ther. Exp.* 46:231-40.