

# ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA PORCINA SOBRE *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>

## Antibacterial Activity of Bovine and Porcine Lactoferrins Against *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>

Gabriela Ramos-Clamont \*, Dora Rodríguez-Franco, Ana María Guzmán-Partida, Evelia Acedo-Félix y Luz Vázquez-Moreno

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación de Ciencia de los Alimentos.

Carretera a la Victoria Km 0.6, Hermosillo, Son. 83000, México. \* Autor para la correspondencia: E-mail: gramos@ciad.mx

### RESUMEN

Se comparó el efecto antibacteriano de las lactoferrinas (Lfs) bovina y porcina sobre *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> (*E. coli* K88<sup>+</sup>), uno de los principales agentes etiológicos de las diarreas en lechones en el hemisferio norte. Las Lfs se purificaron por cromatografía de intercambio iónico, confirmando su pureza por electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) en geles al 8% y por inmuno-detección con anticuerpos anti-lactoferrina. La actividad bacteriostática se probó utilizando concentraciones de 0,5 y 1,0 mg/mL de Holo (saturada de hierro) y Apo-Lf (libre de hierro). En todos los casos la actividad bacteriostática de las Holo-Lfs fue insignificante, mientras que en ambas concentraciones, la Apo-Lf bovina mostró un mayor efecto en la inhibición del crecimiento de la *E. coli* K88<sup>+</sup> que la Apo-Lf porcina. La actividad bactericida se ensayó utilizando concentraciones de 2,0; 4,0; 6,0 y 8,0 mg/mL de Lfs bovina o porcina. La Lf bovina mostró efecto bactericida a una concentración de 8 mg/mL, mientras que la Lf porcina no presentó este efecto. Los resultados indican que la fuente bovina puede ser útil en la prevención de diarreas en lechones.

**Palabras clave:** Lactoferrinas bovina y porcina, actividad antimicrobiana, *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>.

### ABSTRACT

The antibacterial effect of bovine lactoferrin (Lf) towards *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> (*E. coli* K88<sup>+</sup>) was compared with that of porcine Lf. *E. coli* K88<sup>+</sup> is one of the main etiological agents of piglet diarrhea in the northern hemisphere. Lactoferrins (Lfs) were purified by ion exchange chromatography and further analyzed by electrophoresis using 8% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and immuno detection with

anti-lactoferrin antibodies. Bacteriostatic effect was assayed using 0.5 and 1.0 mg/mL of Holo-Lf (iron saturated) or Apo-Lf (iron free). In all test the holo-LFs showed negligible bacteriostatic activity while for Apo-Lfs the bovine protein had the highest activity. Bactericide activity was assayed using bovine or porcine Lf concentrations of 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 mg/mL. Bovine Lf had bactericide activity at 8.0 mg/mL while no growth inhibition was observed with porcine Lf. These results suggest that bovine Lf may serve in the prophylaxis of piglets' diarrhea.

**Key words:** Bovine and porcine lactoferrin, antimicrobial activity, *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>.

### INTRODUCCIÓN

Las bacteremias del tracto gastrointestinal en lechones presentan pérdidas económicas considerables para los porcuicultores; especialmente las infecciones provocadas por *E. coli* K88. Este patógeno es uno de los agentes etiológicos más importantes de las diarreas en lechones en el hemisferio norte [35, 39]. El uso de antibióticos es la práctica regular para contrarrestar estas infecciones. Sin embargo, el suministro inadecuado de estos medicamentos puede inducir resistencia en diversas bacterias [33]. Otro problema es su permanencia como residuos tóxicos en la carne y en los productos cárnicos [3]. Estas dificultades se agudizan debido a la costumbre de administrar cantidades subterapéuticas de antibiótico al alimento del lechón, con el fin de promover su crecimiento [20].

La tendencia mundial del sector agroalimentario es garantizar la inocuidad de los productos que se consumen. Por ello, cada día se restringe más el uso de antibióticos y se promueve el de profilácticos [9]. En este sentido se estudian diferentes proteínas de defensa, prebióticos y probióticos, para prevenir las infecciones [22].

La lactoferrina (Lf) puede ser una opción profiláctica para las infecciones animales. Esta glicoproteína de 78-80 kDa pre-

senta un efecto antimicrobiano contra bacterias patógenas, tanto *in vitro* como *in vivo* [19, 23]. La Lf inhibe o retarda el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas; entre ellas: *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, y *Bacillus subtilis* [23]. También muestra efecto bacteriostático contra *Helicobacter pylori* e inhibe el crecimiento de algunos patógenos resistentes a antibióticos [19, 21].

Las mayores concentraciones de Lf se encuentran en la leche (hasta 0,4%) y particularmente en su calostro, donde la concentración puede llegar al 4% dependiendo del día de lactación [15, 19]. Las fuentes comerciales de esta glicoproteína son la leche descremada de vaca (*Bos taurus-indicus*) o del suero lácteo, que queda como subproducto de la fabricación de queso [31, 34]. Nueva Zelanda es el principal productor de lactoferrina con alrededor de 80 toneladas anuales [31]; el mercado de consumo está dirigido, tanto a productos humanos, como animales [34]. Por su alta producción de queso, México cuenta con grandes cantidades de suero lácteo (alrededor de  $3 \times 10^6$  toneladas anuales) que no se aprovechan y que puedan servir para la producción de Lf y su uso en la prevención de diarreas [31].

La Lf es una molécula exclusiva de los mamíferos. Las principales diferencias entre los genes de las lactoferrinas (Lfs) bovina y porcina (*Sus scrofa domesticus*) y el gen de la Lf humana, se encuentran en los exones 2 y 11. Ello se traduce en secuencias de Lf bovina y Lf porcina con 1 y 2 aminoácidos menos, que la Lf humana [30]. Sin embargo, todas estas moléculas conservan una homología entre sus secuencias del 70% y por tanto, una gran similitud estructural [1]. La semejanza en las estructuras hace pensar que la actividad antimicrobiana de todas las lactoferrinas es similar [19]. No obstante, se ha demostrado que el efecto bactericida de la Lf humana es mayor al de otras Lfs [21, 38]. Otros estudios revelan que la Lf caprina (*Capra aries*) presenta mayor actividad antibacteriana que la bovina, mientras que se desconoce el efecto de la Lf porcina [18, 24]. Debido a lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo comparar la actividad antimicrobiana de las Lfs bovina y porcina sobre la *E. coli* K88<sup>+</sup> enterotoxigénica para el lechón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 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 (*Oryctolagus cuniculus*) (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).

### Muestras

La Lf bovina se purificó del suero lácteo producto de la elaboración de queso fresco. El suero se obtuvo de productos artesanales de la región de Hermosillo, Sonora, México. Se realizaron 6 muestreos, en cada uno se tomaron 4 L de suero. Inmediatamente después de su obtención el suero se transportó en hielo al laboratorio de Bioquímica de Proteínas del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), se centrifugó (Beckman Coulter Allegra 6, Brea, CA, EUA) a 2690 g por 20 min a 4°C y se filtró en condiciones de vacío, utilizando papel filtro watman No.1, fibra de vidrio y una membrana de 0,45 µm. 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 [37]. Posteriormente, el suero se separó en alícuotas y almacenó en tubos de polietileno a -40°C (Revco ULT-2140, Termo Scientific, EUA) hasta su uso.

La Lf porcina se purificó a partir de calostro obtenido de dos granjas porcinas del municipio de Hermosillo, Sonora. Se realizaron 6 muestreos de 300 mL de calostro provenientes de 6 cerdas recién paridas. Las muestras se transportaron al CIAD en envases estériles a 4°C y se centrifugaron a 2950 g por 20 min a 4°C, para eliminar la grasa. Posteriormente se ajustó el pH a 4,6 con HCl 0,5 N a 20°C, para precipitar a la caseína, separándola por centrifugación, bajo las condiciones mencionadas anteriormente [37]. 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 a -40°C hasta su uso.

### Purificación de lactoferrina

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

Para obtener la Lf se utilizó el esquema de captura propuesto por Fee y Chand [13]. La matriz se equilibró con 5VC de solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM, pH 6.7 (Solución A). El suero (90 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. La elución se promovió en presencia de la sal, primero, con 2VC de solución A con 0,1M de NaCl y posteriormente desarrollando un gradiente de 0,1–1,0 M de NaCl, utilizando la misma solución amortiguadora. Finalmente, la columna se regeneró lavándola con 5VC de NaCl 1 M, 2VC de NaOH 1 M y 10VC de agua Milli Q para luego volverse a equilibrar con 5VC la solución A. A las fracciones obtenidas se les estimó la concentración de proteína por el método de Bradford [4], utilizando una curva estándar obtenida con albú-

mina de suero bovino (BSA). La purificación de Lf porcina se llevó a cabo de la misma manera.

### Electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección

Las Lfs se identificaron mediante el análisis electroforético de las fracciones cromatográficas y por inmunodetección. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE), según Laemmli [17], en geles de poli-acrilamida al 10%; se aplicaron 8 µg de proteína por pozo. Las masas moleculares de las proteínas separadas se compararon con estándares de proteína (BioRad, Hercules, CA, EUA). Los geles se corrieron a 100 V en una cámara Hoeffer Mighty Small 250 (Hoeffer, San Francisco, CA, EUA) y se tiñeron con nitrato de plata [7].

El ensayo de inmunodetección se llevó a cabo según Towbin y col. [32]. Las fracciones cromatográficas 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, EUA) por 40 min a 2,5 mA/cm<sup>2</sup>. La presencia de Lf se detectó con anti-Lf bovina desarrollada en cabra; se utilizó anti IgG de cabra ligada a peroxidasa como segundo anticuerpo y se promovió el desarrollo de color con el sustrato 3,3'-Diaminobenzidina.

### Actividad bacteriostática

La actividad bacteriostática se determinó de acuerdo a Suzuki y col. [29] con algunas modificaciones. Se ensayó con Apo y Holo Lf bovina y porcina. Para la obtención de la forma Apo, la lactoferrina se dializó contra una solución de ácido cítrico 0,1 M durante 48 h, y posteriormente contra agua Milli Q durante 48 h [10]. La forma Holo se obtuvo saturando a la molécula con hierro, al dializarla contra FeCl<sub>3</sub> 60 mM utilizando la metodología propuesta por Schryvers y Morris [25]. 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, obtenidas en un espectrofotómetro (SmartSpec, BioRad, Hercules, CA, EUA) UV-visible [25].

La *E. coli* K88<sup>+</sup> fue donada por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y conservada a -80°C hasta su uso [16]. El microorganismo fue aislado de lechones mexicanos susceptibles a su infección. Se estableció el inicio de la fase exponencial de crecimiento de la *E. coli* K88<sup>+</sup> en caldo nutritivo a 37°C mediante la obtención de su curva de crecimiento [16]. Los ensayos se realizaron por triplicado. El inicio de la fase exponencial correspondió a una densidad óptica de 0,500 determinada por espectroscopia a una longitud de onda de 600 nm y a aproximadamente 2,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL determinadas en agar para recuento estándar.

La actividad bacteriostática se ensayó en caldo nutritivo deficiente en hierro. Para obtenerlo se mezcló el medio con la matriz Sefarosa-Acido Imidoacético (Sefarosa-IDA) durante 3 h. La concentración de Sefarosa-IDA fue de 30% (peso/volu-

men). Al término del tratamiento la mezcla se centrifugó a 2860 g durante 20 min a 4°C para separar la matriz. El caldo obtenido se esterilizó 15 min a 121°C, en matraces Erlenmeyer en volúmenes de 300 mL [29]. La actividad de las Lfs se ensayó añadiendo al caldo concentraciones de 0,5 ó 1 mg/mL e inoculando con 1 mL de *E. coli* K88<sup>+</sup> a concentración aproximada de 2,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Los matraces se incubaron a 37°C para determinar la curva de crecimiento. Cada tratamiento se ensayó por triplicado, utilizando como control el caldo deficiente en hierro, inoculado con la misma concentración de bacterias y añadido con agua miliQ en vez de Lf.

### Actividad bactericida

Para la actividad bactericida se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) según Del Olmo y col. [8], con ligeras modificaciones. Se adicionaron 5 µL de un cultivo de *E. coli* K88<sup>+</sup> (aproximadamente 2,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) a placas de ELISA de 96 pozos, estériles. En seguida, se añadieron a los pozos 100 L de caldo nutritivo y diferentes concentraciones de las Lfs bovina o porcina (2; 4; 6 y 8 mg/mL), purificadas por intercambio iónico. Las placas se taparon, se incubaron a 37°C durante 20 h y transcurrido este tiempo, se leyeron a 600 nm en un lector de ELISA (BioRad, Hercules, CA, EUA). Los experimentos se realizaron por triplicado, cada réplica con 2 observaciones.

Se consideró como la CMI la mínima cantidad de lactoferrina capaz de impedir el crecimiento bacteriano, determinada por triplicado en siembra en placa, utilizando agar para recuento estándar.

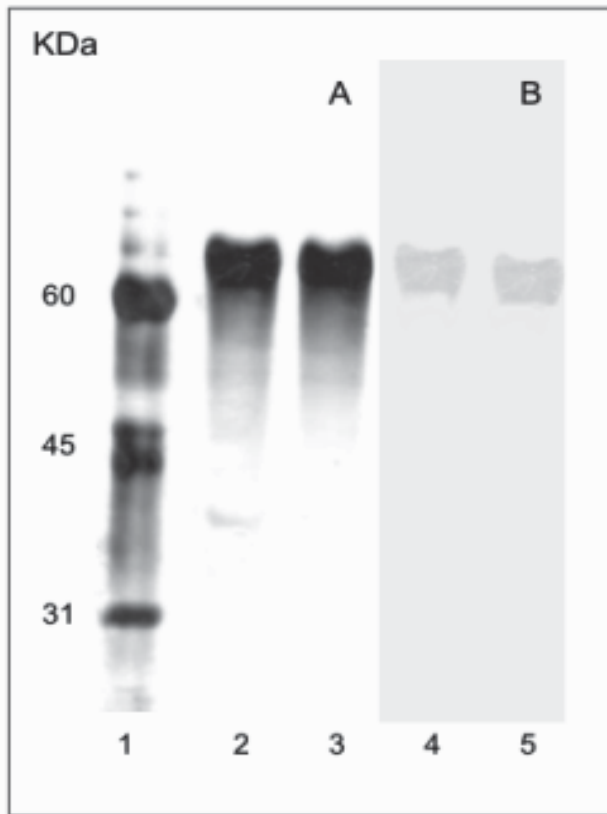
### Análisis estadístico

Para la actividad bacteriostática se practicó la estadística descriptiva, obteniéndose la media y desviación estándar de los datos, los cuales se graficaron con el programa Sigma Plot versión 9 (Systat Software, EUA) [26]. Para la actividad bactericida se realizó un análisis de varianza (ANOVA), obteniéndose la diferencia de medias por la prueba de Duncan (P < 0,05). Se utilizó el paquete de diseños experimentales Statistica, versión 4,5 (StatSoft Inc. EUA) [27].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Purificación de lactoferrinas bovina y porcina

La FIG. 1 muestra el gel y western blot de las fracciones de Lfs bovina y porcina, correspondientes al pico de elución obtenido a una concentración de NaCl de 0,8 M. Se obtuvieron 110 mg de Lf bovina y 170 de Lf porcina. Los geles mostraron una banda de aproximadamente 80 kDa (carriles 2 y 3), cuya masa corresponde a la de la Lf [19]; la identidad de las bandas se comprobó por inmunodetección con anti-lactoferrina bovina, que reconoció, tanto a la Lf bovina (carril 4) como a la Lf porcina (carril 5) debido a la alta homología entre sus secuencias [19].



**FIGURA 1. ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN DE LAS FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS DE LACTOFERRINAS BOVINA Y PORCINA. (A) ELECTROFORESIS, CARRIL 1, ESTÁNDARES DE MASA MOLECULAR; CARRIL 2, LACTOFERRINA BOVINA; CARRIL 3, LACTOFERRINA PORCINA. (B). INMUNODETECCIÓN CON ANTI-LACTOFERRINA BOVINA. CARRIL 4, LACTOFERRINA BOVINA; CARRIL 5, LACTOFERRINA PORCINA/ ELECTROPHORESIS AND IMMUNODETECTION OF BOVINE AND PORCINE CHROMATOGRAPHIC FRACTIONS. (A) ELECTROPHORESIS, LANE 1, WEIGHT MOLECULAR STANDARDS, LANE 2, BOVINE LACTOFERRIN; LANE 3 PORCINE LACTOFERRIN. (B) IMMUNODETECTION WITH BOVINE ANTI-LACTOFERRIN ANTIBODY. LANE 4 BOVINE LACTOFERRIN; LANE 5, PORCINE LACTOFERRIN.**

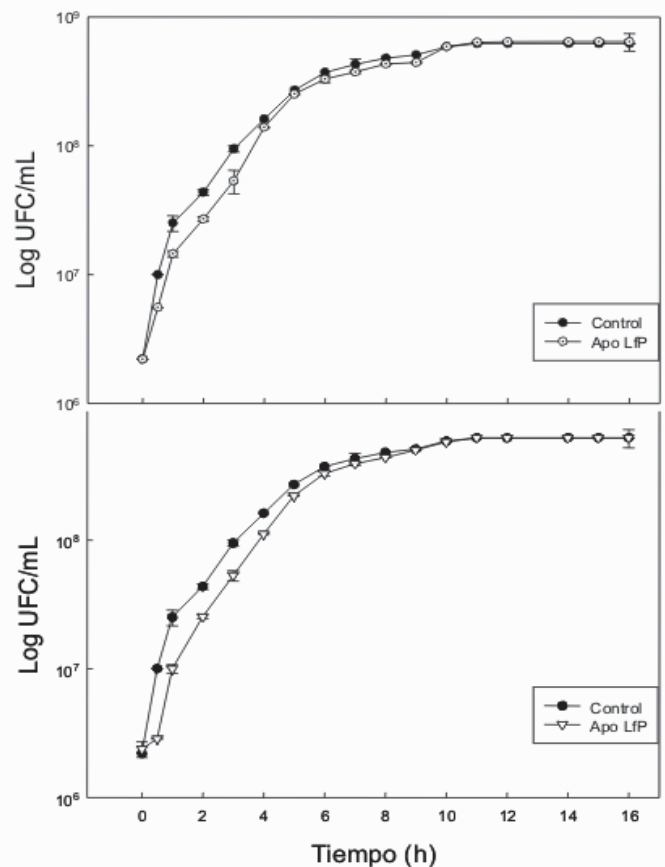
**Actividad bacteriostática**

Las concentraciones de hierro en la Holo y Apo lactoferrina, determinadas por espectrofotometría fueron de  $84,5 \pm 2,1$  y  $3,3 \pm 0,8\%$ , respectivamente. El hierro es un elemento indispensable para el crecimiento de las bacterias y por tanto, la actividad bacteriostática de la lactoferrina se basa en su capacidad para ligar al hierro del medio [8]. En base a lo anterior se justifica el hecho de que las Holo Lfs bovina y porcina, no hayan presentado ninguna influencia sobre el crecimiento de la *E. coli* K88<sup>+</sup> (datos no mostrados). En cambio, las Apo lactoferrinas si lograron retrasar el crecimiento de la bacteria.

En la FIG. 2 se compara el efecto de las Apo-lactoferrinas porcina y bovina sobre el crecimiento de *E. coli* K88<sup>+</sup> al uti-

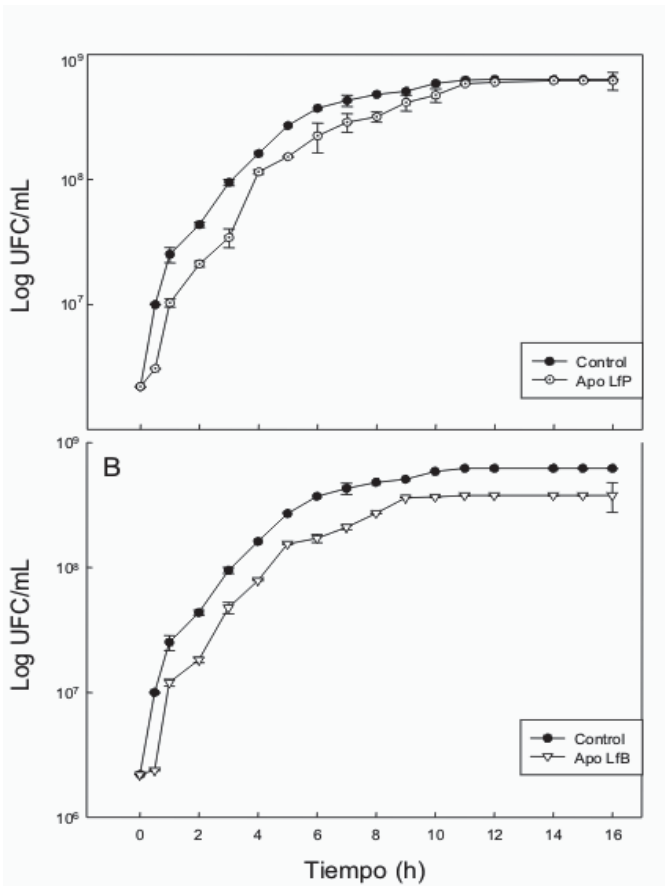
lizar concentraciones de 0,5 mg/mL. La Lf porcina retrasó el crecimiento bacteriano durante las primeras 4 h de incubación, mientras que la bovina durante 6 h (FIG. 2A y FIG. 2B, respectivamente). En ambos casos, el efecto bacteriostático fue mayor al aumentar la concentración de lactoferrina a 1 mg/mL (FIG. 3). Sin embargo, en ambas concentraciones, la Lf bovina fue más efectiva. La forma Apo (libre de hierro) de la Lf se encuentra en las secreciones mucosas de los mamíferos, donde tiene la posibilidad de secuestrar al metal en los sitios de infección, privando a las bacterias de un nutriente esencial para su crecimiento [19].

Otros autores observaron el efecto bacteriostático de la Apo-Lf bovina utilizando diferentes cepas de *E. coli*. Griffiths y col. [14], probaron 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 y col. [37], observaron un retraso de 2 h en el crecimiento de *E. coli* IFO 3301 en presencia de Apo-Lf bovina. El efecto de la Apo-Lf bovina se pierde cuando se incuba con la bacteria en un medio de crecimiento saturado con hierro [29].



**FIGURA 2. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> EN CALDO NUTRITIVO CON 0,5 MG/ML DE LACTOFERRINAS PORCINA (A) O BOVINA (B)/ GROWTH CURVES OF *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> IN NUTRIENT BROTH WITH 0.5 MG/ML OF PORCINE (A) OR BOVINE (B) LACTOFERRINS.**





**FIGURA 3. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> EN CALDO NUTRITIVO CON 1,0 MG/ML DE LACTOFERRINAS PORCINA (A) O BOVINA (B)/ GROWTH CURVES OF *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> IN NUTRIENT BROTH WITH 1.0 MG/ML OF PORCINE (A) OR BOVINE (B) LACTOFERRINS.**

*In vivo*, una de las estrategias más comunes de los microorganismos para secuestrar hierro es la producción de sideróforos [5]. Estas pequeñas moléculas solubles captan el hierro de la Lf y posteriormente son internalizadas en la bacteria, al ser reconocidas por receptores extracelulares [11]. En *E. coli* existen 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 [6]. Los sideróforos presentan gran afinidad por proteínas bacterianas superficiales cuya expresión aumenta durante la infección *in vivo* y el crecimiento *in vitro* [5]. Lo anterior favorece la disminución del efecto bacteriostático de la Lf después de un periodo de adaptación de la bacteria [6].

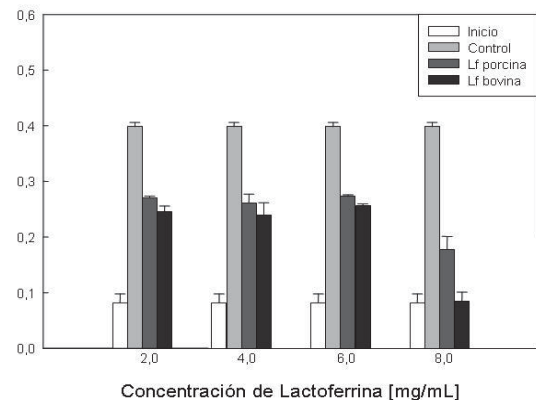
La expresión de proteínas superficiales que reconocen a los sideróforos depende de la cepa de *E. coli* [5, 6]. Lo anterior explica porqué la lactoferrina presenta un mayor o un menor efecto bacteriostático en el crecimiento de diferentes cepas de esta bacteria.

**Actividad bactericida**

No se observó un efecto bactericida de la Lf porcina sobre *E. coli* K88<sup>+</sup> a las concentraciones estudiadas, mientras que se requirieron 8 mg/mL de Lf bovina para que este efecto se presentara (FIG. 4); lo anterior se comprobó por siembra en placa. La capacidad bactericida de la Lf se atribuye a la interacción directa de la molécula o parte de ella, con la membrana externa de los microorganismos Gram negativos [19, 36]. Se sabe que la Lf bovina interacciona por diferencia de cargas eléctricas, con las moléculas de lipopolisacárido (LPS). Esto provoca la liberación de los LPS aumentando la permeabilidad de la membrana y produciendo la liberación del contenido citoplasmático de la bacteria [19, 36].

La secuencia N-terminal (aminoácidos del 17 al 48) de la Lf, conocida como lactoferrina, es la parte de la molécula que causa su efecto bactericida [2, 28]. Al parecer, tanto la presencia de aminoácidos catiónicos, como del triptofano son críticas para que la lactoferrina interacciones con la membrana externa de los patógenos [28]. La lactoferrina bovina es rica en aminoácidos catiónicos y contiene 2 triptofanos, mientras que la porcina contiene menos aminoácidos catiónicos y 1 solo triptofano [2, 28]. Estas diferencias pudieran explicar la ausencia de efecto bactericida de la Lf porcina sobre la *E. coli* K88<sup>+</sup>.

Tomita y col. [31] reportaron una CMI de 2 mg/mL de Lf bovina para diferentes cepas de *E. coli*, mientras que Yamau-chi y col. [36] encontraron que una concentración de 3 mg/mL fue suficiente para destruir a *E. coli* O157:H7. Estos resultados se obtuvieron utilizando peptona al 1%. Sin embargo, en matrices más complejas, la presencia de otros compuestos puede afectar el efecto de la lactoferrina. Tal es el caso de los iones Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> cuya presencia en el medio disminuye su capacidad para producir la liberación de LPS [12].



**FIGURA 4. EFECTO BACTERICIDA DE LACTOFERRINAS PORCINA Y BOVINA SOBRE *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>. DIFERENTES LETRAS INDICAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (P<0,05) A UNA MISMA CONCENTRACIÓN/ BACTERICIDAL EFFECT OF PORCINE AND BOVINE LACTOFERRIN OVER *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>. DIFFERENT LETTERS SHOW A STATISTICAL SIGNIFICANT (P<0.05) DIFFERENCE AT THE SAME CONCENTRATION.**

## CONCLUSIONES

En este estudio se observó que la Lf bovina presenta actividad bactericida contra la *E. coli* K88<sup>+</sup>, cuando se utilizan concentraciones de 8mg/mL. A concentraciones menores, retrasó el crecimiento de la bacteria, durante un mayor periodo de tiempo que la Lf porcina, la cual no presentó actividad bactericida a las concentraciones estudiadas. En base a lo anterior se concluye que la Lf bovina es más efectiva para el control de *E. coli* K88<sup>+</sup>, que la porcina. Este hecho representa ventajas tecnológicas y ambientales debido a que la fuente comercial de Lf bovina es el subproducto líquido de la elaboración de queso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAKER, E. N.; BAKER, H. M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cell. Mol. Life Sci.** 62: 2531–2539. 2005.
- [2] BELLAMY, W.; TAKASE, M.; YAMAUCHI, K.; WAKABAYASHI, H.; KAWASE, K.; TOMITA, M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. **Biochem. Biophys. Acta.** 1121:130-136. 1992.
- [3] BERMÚDEZ-ALMADA, M.D.; MIRANDA-VASQUEZ, L.; ESPINOSA, A.; VALENZUELA-QUINTANAR, A.I.; VAZQUEZ-MORENO, L. Sulphonamide residues in muscle of pigs slaughtered in the Northwest of Mexico. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.**XI (2):127–132. 2001.
- [4] BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254. 1976.
- [5] BRAUN, V.; BRAUN, M. Iron transport and signaling in *E.coli*. **FEBS Lett.** 529:78–85. 2002.
- [6] CHAKRABORTY, R.; STOREY, E.; VAN DER HELM, D. Molecular mechanism of ferric siderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. **Biometals.** 20 (3-4):263-74. 2007.
- [7] CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T.; Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nat. Protoc.** 1(4): 1852-1858. 2006.
- [8] DEL OLMO, A.; MORALES, P.; NUÑEZ, M. Bactericidal effect of lactoferrin and its aminated and pepsin digested derivatives on *Pseudomonas fluorescens*: Influence of environmental and physiological factors. **J Food Protect.** 71 (12):2468-2474. 2008.
- [9] DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poult Sci.** 84(4): 634-643. 2005.
- [10] DIONYSIUS, D.A.; GRIEVE, P.A.; MILNE, J.M. Forms of lactoferrin: Their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Dairy Sci.** 76:2597-2606. 1993.
- [11] EISENHAUER, H.A.; SHAMES, S.; PAWELEK, P.D.; COULTON, JW. Siderophore transport through *E. coli* outer membrane receptor FhuA with disulfide-tethered cork and barrel domains. **J. Biol. Chem.** 280: 30574-30580. 2005.
- [12] ELLISON III, R.T.; LAFORCE, F.M.; GIEHL, T.J.; BOOSE, D.S.; DUNN, B.E. Lactoferrin and transferrin damage of the Gram-negative outer membrane is modulated by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. **Microbiol.** 136: 1437-1446. 1990.
- [13] FEE, C.; CHAND, A. Capture of lactoferrin and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography. **Sep. Purific. Technol.** 48:143-149. 2006.
- [14] GRIFFITHS, E.; DUFFY, L.C.; SCHANBACHER, F.L. *In vitro* growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin. **Diges. Dis. Sci.** 48(7):1324-1332. 2003.
- [15] HENNART, P.F.; BRASSEUR, D.J.; DELOGNE, J.B.; DESNOECK, M.; DRAMAIX, M.; ROBYN, C.E. 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. 1991.
- [16] JIN, L.Z.; MARQUARDT, R. R; ZHAO, X. A Strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(10): 4200-4204. 2000.
- [17] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature.** 227:680-685. 1970.
- [18] LEE, T.H.; SHIMAZAKI, K.; YU, S.L.; NAM, M.S.; KIM, S.J.; LEE, K.K.; YU, D.Y. Polymorphic sequence of Korean Native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial activity. **Anim. Genet.** 28:367-369. 1997.
- [19] LEVAY, P.F.; VILJOEN, M. Lactoferrin: a general review. **Acta Haematol.** 80:252-267. 1995.
- [20] MATHEW, A.G.; JACKSON, F.; SAXTON, A.M. Effects of antibiotic regimens on resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* serovar *Typhimurium* in swine. **J. Swine Health Prod.** 10(1):7-13. 2002.
- [21] NIBBERING, P.H.; RAVENSBERGEN, E.; WELLING, M.M.; VAN BERKEL, L.A.; VAN BERKEL, P.H.C.; PAUWELS, E.K.J.; NUIJENS, J.H. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. **Infect. Immun.** 69(3):1469-1476. 2001.
- [22] NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. **J. Biosci. Bioeng.** 100 (6): 583-592. 2005.
- [23] OCHOA, T.J.; CLEARY, T.G. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. **Biochimie.** 91 (1): 30-34. 2009.

- [24] RECIO, I.; VISSER, S. Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: A comparative study. **Int. Dairy J.** 10:597-605. 2000.
- [25] SCHRYVERS, A.B.; BONNAH, R.; YU, R.H.; WONG, H.; RETZER, M. Bacterial lactoferrin receptors. **Adv. Exp. Med. Biol.** 443:123-133. 1998.
- [26] SIGMA PLOT. Sigma Plot for windows version 9.0 Systat Software, Inc. San Jose, CA, USA.
- [27] STATISTICA. Statistica for windows version 4.5 Stat-Soft, Inc. Tulsa, USA.
- [28] STROM, M. B.; HAUG, B. E.; REKDAL, O.; SKAR, M. L.; STENSEN, W.; SVENDSEN, J. S. Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. **Biochem. Cell Biol.** 80: 65-74. 2002.
- [29] SUZUKI, T.; YAMAUCHI, K.; KAWASE, K.; TOMITA, M.; KIYOSAWA, I.; OKONOGLI, S. Collaborative bacterostatic activity of bovine lactoferrin with lysozyme against *Escherichia coli* O111. **Agric. Biol. Chem.** 53: 1705–1706. 1989.
- [30] TENG, C. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. **Biochem. Cell Biol.** 80: 7–16. 2002.
- [31] TOMITA, M.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TERAGUCHI, S.; HAYASAWA, H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. **Biochem. Cell Biol.** 80:109-112. 2002.
- [32] TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 76:4350-4354. 1979.
- [33] VARGA, C.; RAJIÆ, A.; MCFALL, M.E.; REID-SMITH, R.J.; DECKERT, A.E.; CHECKLEY, S.L.; MCEWEN, S.A. Associations between reported on-farm antimicrobial use practices and observed antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* isolated from Alberta finishing swine farms. **Prev. Vet. Med.** 88(3):185-192. 2009.
- [34] WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TAKASE, M. Lactoferrin research, technology and applications. **International Dairy J.** 16:1241–1251. 2006.
- [35] WRAY, C.; WOODWARD, M. *Escherichia coli* Infections in farm animals. In: SUMMON, E. W. (Ed.) **Escherichia coli: mechanisms of virulence**, Cambridge University Press, Cambridge, England. 49-84pp. 1997.
- [36] YAMAUCHI, K.; TOMITA, M.; GIEHL, T.; ELLISON III, R. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. **Infect. Immun.** 61(2):719-728. 1993.
- [37] YOSHIDA, S.; WEI, Z.; SHINMURA, Y.; FUKUNAGA, N. Separation of lactoferrin-a and -b from bovine colostrum. **J. Dairy Sci.** 83:2211–2215. 2000.
- [38] ZHANG, G. H.; MANN, D. M.; TSAI, C. M. Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by a human lactoferrin-derived peptide. **Infect. Immun.** 67:1353-1358. 1999.
- [39] ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, A. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Vet. Microbiol.** 123: 145-152. 2007.