

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
Facultad de Ciencias**

**“Efecto de la administración oral de lactoferrina sobre  
la expresión de factores de la inmunidad intestinal  
implicados en el control de la infección causada por  
*Salmonella* en ratones”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MARIA ELISA DRAGO SERRANO**

**DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ  
TUTOR PRINCIPAL DE TESIS**

**DRA. LETICIA MORENO FIERROS  
COMITÉ TUTOR**

**DRA. INGEBORG D. BECKER FAUSER  
COMITÉ TUTOR**

**MEXICO, D.F.**

**MARZO DE 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de enero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de del (la) alumno (a) **DRAGO SERRANO MARIA ELISA** con número de cuenta **73091411** con la tesis titulada: "Efecto de la administración oral de lactoferrina sobre la expresión de factores de la inmunidad intestinal implicados en el control de la infección causada por *Salmonella* en ratones", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ**:

Presidente:	DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Vocal:	DRA. GUADALUPE MIREYA DE LA GARZA AMAYA
Vocal:	DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Vocal:	DR. FERNANDO GARCÍA TAMAYO
Secretario:	DRA. LETICIA MORENO FIERROS

De acuerdo con lo anterior, la alumna se acogió a la nueva normatividad, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (9 de octubre de 2006).

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 3 de marzo de 2011.

*María del Coro Arizmendi Arriaga*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **Agradecimientos**

**Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias, UNAM por haberme otorgado la oportunidad de obtener las bases académicas y las habilidades prácticas adquiridas en el trabajo experimental necesarias para proseguir futuros trabajos de investigación.**

**Quiero expresar mi reconocimiento al Comité Tutor: Dra. Leticia Moreno Fierros y Dra. Ingeborg D. Becker Fauser por su valioso apoyo y asesoría cruciales para el logro y conclusión de esta tesis.**

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>III. ANTECEDENTES</b>	
<b>3.1 Características generales de la lactoferrina</b>	<b>12</b>
<b>A. Distribución</b>	
<b>B. Estructura y propiedades fisicoquímicas</b>	
<b>C. Efectos antimicrobianos <u>in vitro</u></b>	
<b>3.2 Efectos de la lactoferrina sobre células inmuno-competentes</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Efecto de la lactoferrina en modelos animales de infección</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Patogénesis de <u>Salmonella typhimurium</u> en ratón</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Respuesta inmune intestinal contra <u>Salmonella typhimurium</u> en ratón</b>	<b>26</b>
<b>3.6 Respuesta inmune sistémica contra <u>Salmonella typhimurium</u> en ratón</b>	<b>30</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>34</b>
<b>IV. METODOLOGÍA</b>	<b>35</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b>	<b>57</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>59</b>
<b>X. FIGURAS</b>	<b>74</b>

## RESUMEN

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína monomérica no hémica de 80 kDa de la familia de las transferrinas. Por su capacidad de captar en forma reversible dos iones férricos ( $Fe^{3+}$ ), la Lf presenta una forma libre (apoLf) y otra forma asociada (holoLf) a hierro. La Lf es un componente esencial de los mecanismos innatos de defensa del hospedero. En la actualidad la Lf bovina (bLf) ha sido (junto con la Lf humana) la mejor caracterizada desde un punto de vista estructural y funcional. La Lf es una molécula multifuncional con actividad inmunoreguladora entendida ésta como la capacidad de afectar positiva o negativamente componentes de la respuesta adaptativa como células presentadoras de antígeno (CPA), linfocitos Th1, Th2, así como la producción a nivel sistémico y local de componentes humorales como anticuerpos y citocinas. Ensayos *in vitro* muestran que la Lf posee actividad antibacteriana sobre todo de tipo bacteriostático contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. La Lf ejerce su efecto antibacteriano en forma i) indirecta mediante su capacidad de captar el hierro esencial para el crecimiento bacteriano y ii) directa tras interaccionar con componentes estructurales de la superficie bacteriana y dañar su permeabilidad. Modelos animales de infección experimental muestran que a través de su efecto inmunomodulador, la Lf incrementa la resistencia bacteriana contra Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), Helicobacter pylori, Shigella flexneri y Listeria monocytogenes. La actividad antibacteriana de la Lf sobre Salmonella (S.) enterica serovariedad Typhimurium (S. typhimurium) ha sido evaluada sobre todo en algunos ensayos *in vitro*. Salmonella typhimurium es una bacteria enteropatógena Gram negativa causante de gastroenteritis en humanos. La infección oral con S. typhimurium en ratones se aplica como modelo animal de experimentación de la fiebre tifoidea humana causada por Salmonella typhi. Debido a que el control del crecimiento bacteriano ejercido por la Lf es resultado de su actividad inmunoreguladora, el objetivo del presente trabajo fue estimar el efecto de la Lf en la infección causada por S. typhimurium en ratones, el cual ha sido escasamente explorada *in vivo*. En el presente estudio, ratones Balb / c fueron tratados diariamente por vía oral durante 7 días con 5 ó 100 mg diarios de bLf. En el día 7 de tratamiento, los ratones fueron infectados por vía intragástrica con una dosis letal o subletal de S. typhimurium. Después de sacrificar los animales en los días 7, 14 ó 21 post-infección, en muestras de líquido intestinal, placas de Peyer (PP), hígado y bazo, se estimó el número de UFC por dilución en placa. En las secreciones intestinales y suero, se evaluaron los niveles de IgA, IgG e IgM, totales, contra las proteínas de superficie de Salmonella y contra bLf por ELISA. En los ratones letalmente infectados, ambas dosis de bLf redujeron significativamente la mortalidad. En ratones subletalmente infectados, ambas dosis de bLf redujeron significativamente la eliminación

bacteriana en las heces y en el líquido intestinal, y también redujeron la colonización bacteriana en PP, hígado y bazo. Los anticuerpos IgG e IgM en suero e IgA en las secreciones intestinales totales, contra las proteínas de la superficie de Salmonella y contra bLf, aumentaron en forma significativa con ambas dosis de bLf. Estos resultados sugieren que el efecto de la bLf en la infección por S. typhimurium en ratones puede ser el resultado de una actividad antimicrobiana relacionada con su efecto inmunomodulador positivo sobre las células inmunocompetentes (de órganos intestinales y periféricos) que participan en la producción de anticuerpos. El estudio de los efectos sustantivos de la bLf sobre la respuesta inmune humoral intestinal y sistémica del organismo para controlar la infección por S. typhimurium es relevante para evaluar la posibilidad de emplear esta sustancia como un agente terapéutico o inmunomodulador en las infecciones causadas por cepas de S. typhimurium que son multi-resistentes a los antibióticos.

## ABSTRACT

Lactoferrin (LF) is a nonheme monomeric glycoprotein of 80 kDa belonging to the transferrin protein family. At present, bovine Lf (bLf) and human Lf (hLf) have been the best characterized from a structural and functional standpoint. Lf is an essential component of host innate defense mechanisms, modulating the activity of cellular components of the adaptive immune response (e.g., antigen presenting cells, Th1, and Th2) and producing systemic and local humoral components (e.g., antibodies and cytokines). *In vitro* assays show that Lf displays antibacterial, mainly bacteriostatic, activity against Gram positive and Gram negative bacteria. Lactoferrin displays its antibacterial activity principally through two mechanisms: i) an indirect mechanism based on its ability to bind iron essential for bacterial growth, and ii) a direct mechanism consisting of its interaction with structural components of bacterial surface. Studies in animal models of experimental infection show that the immunoregulatory activity of Lf increases the host resistance against bacterial infections caused by enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC), Helicobacter pylori, Shigella flexneri and Listeria monocytogenes. However, the antibacterial activity of Lf on Salmonella (S.) enterica serovar Typhimurium (S. typhimurium) has scarcely been evaluated *in vivo*, as almost all studies on this bacterium have been conducted *in vitro*. Salmonella typhimurium is a Gram-negative enteropathogenic bacterium that causes human gastroenteritis. The present study explores the immunoregulatory properties of Lf *in vivo* in a mouse model of S. typhimurium infection.

Balb/c mice were treated orally for 7 days with either 5 or 100 mg of bLf. On day 7 of treatment, mice were intragastrically infected with a lethal or sublethal dose of colony forming units (CFU) of S. typhimurium. During treatment with bLf for 21 days post-infection, feces from mice sublethally infected were harvested daily to prepare fecal suspensions, which were serially diluted and plated onto Salmonella-Shigella agar to estimate CFU/g of feces. After sacrificing the animals on day 7, 14 or 21 post-infection, samples of intestinal fluid, Peyer's patches (PPs), liver and spleen were collected to count the number of CFU by plate dilution. Intestinal secretions were also employed, along with serum samples, to evaluate total IgA, IgG and IgM antibodies, and those against Salmonella surface proteins and bLf by ELISA assay.

In lethally infected mice both bLf doses decreased mortality. In sublethally infected mice, both bLf doses decreased bacterial shedding in feces and intestinal fluid, and also reduced bacterial colonization at PPs and bacterial translocation in the liver and spleen. Levels of total antibodies, of IgG and IgM in serum, and of IgA in intestinal secretions against Salmonella surface proteins were enhanced with both doses of bLf. These findings suggest that the effect of bLf against infection by S. typhimurium in mice may be the result of an antimicrobial activity linked with its



modulatory effect on immunocompetent cells (from intestinal and peripheral organs) involved in antibody production. The study of the substantive effects of bLf on the cellular, humoral and systemic intestinal immune response to control S. typhimurium infection could have important implications for treatment of infections with strains of this bacterium that are multi-resistant to antibiotics.

## I. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies de mamíferos produce una proteína de origen animal conocida como lactoferrina (Lf). A partir de su aislamiento, ocurrido en 1939 en leche bovina [1] y en 1960 en leche humana [2], la Lf bovina (bLf) y la humana (hLf) han sido extensivamente analizadas desde un punto de vista estructural, antimicrobiano, clínico y molecular [3] [4]. Estos estudios han tenido repercusiones prácticas para su aplicación clínica, farmacéutica y alimentaria que han motivado, incluso, la producción industrial a gran escala de Lf tanto nativa como recombinante [5]. Además de su importancia histórica, bLf y hLf son las Lfs más relevantes desde un punto de vista de su actividad biológica, y por ende, son en la actualidad las mejor caracterizadas estructural y funcionalmente.

Genéricamente hablando, la Lf es un miembro de la familia de proteínas no hémicas de unión a hierro conocidas como transferrinas [6], que incluye también a la propia transferrina (Tf) y a la ovotransferrina (ovoTf). Al igual que la transferrina sérica, la Lf se caracteriza por captar en forma reversible dos iones férricos ( $Fe^{3+}$ ) para generar una forma libre y otra asociada al  $Fe^{3+}$  denominadas apoLf y holoLf, respectivamente. A diferencia de otras transferrinas, la Lf es un componente de los mecanismos innatos de defensa [7] que exhibe un amplio espectro de funciones biológicas, tales como sus actividades anti-tumorales [4], inmunoreguladoras [8] y antimicrobianas [9]

La Lf ha sido reconocida como una molécula inmunoreguladora que bajo condiciones fisiológicas normales o de enfermedad, afecta positiva o negativamente la actividad de componentes celulares de la respuesta inmunitaria adaptativa como células presentadoras de antígeno (CPA) [10], linfocitos Th1, Th2 [11], así como la producción a nivel sistémico y local de componentes humorales como anticuerpos y citocinas [12,13].

La actividad antimicrobiana de la Lf es a su vez muy amplia e incluye a hongos, virus, protozoarios y bacterias [9]. En el caso de las bacterias, se ha sugerido que la Lf ejerce su actividad antibacteriana en dos formas: (i) indirecta, mediante su capacidad de captar el hierro

esencial para el crecimiento bacteriano [14] y (ii) directa, al alterar la permeabilidad bacteriana después de interactuar con componentes estructurales anclados en la superficie de bacterias; éstos incluyen al ácido lipoteicoico [15] de Gram positivas, así como porinas [16] y lipopolisacárido (LPS) [17] de Gram negativas. Estos mecanismos antibacterianos han sido evaluados en ensayos *in vitro* [18], pero en condiciones fisiológicas, la actividad antibacteriana de la Lf surge como un efecto secundario de su acción moduladora sobre componentes humorales y celulares de la respuesta inmunitaria a niveles local y sistémico [19].

Estudios en modelos animales de infección experimental muestran que la Lf posee efectos antibacterianos contra Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), Helicobacter pylori, Shigella flexneri y Listeria monocytogenes [20]. En el caso particular de Salmonella enterica serovariedad Typhimurium (S. typhimurium) un entero-patógeno causante de enteritis humana, la actividad de la Lf ha sido explorada en un número limitado de ensayos *in vitro* [16, 21, 22, 23, 24, 25] e *in vivo* [26, 27].

En este trabajo se presentan resultados obtenidos al evaluar el efecto de la administración oral de bLf sobre la resistencia contra la infección causada por S. typhimurium en ratones y su relación con la producción local y sistémica de anticuerpos. Por lo anterior, se puso énfasis en los modelos animales aplicados para explorar el papel regulador de la bLf sobre componentes celulares y humorales involucrados en la producción de anticuerpos y en el efecto antibacteriano. Así mismo, se describen los componentes de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa implicados en el control de la infección intestinal y extraintestinal causadas por S. typhimurium en ratones susceptibles, por ejemplo Balb/C, pues es el modelo animal de experimentación de la tifoidea humana causada por Salmonella enterica serovariedad Typhi (S. typhi).

## **II. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la bLf sobre la infección intestinal y extraintestinal causada por S. typhimurium y sobre algunos componentes de la inmunidad intestinal y la sistémica implicados en el control de la infección.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar en ratones infectados por vía intragástrica con S. typhimurium y tratados por vía oral con bLf

1. La eliminación bacteriana intestinal en heces y líquido intestinal
2. La colonización bacteriana en placas de Peyer, hígado y bazo
3. La producción total de IgG e IgM en suero e IgA en líquido intestinal
4. La producción de IgG e IgM en suero y de IgA en líquido intestinal contra las proteínas de superficie de S. typhimurium y contra bLf.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Características generales de la lactoferrina

##### A. Distribución

Junto con otras moléculas antimicrobianas como lisozima y peroxidasa, la Lf es considerada como un componente esencial que participa en los mecanismos innatos de defensa [7]. Lo anterior se apoya en que la Lf es un agente anti-microbiano estratégicamente distribuido en las mucosas que funcionan como barreras anatómicas de defensa contra agentes que colonizan y/o invaden nuestro organismo. La Lf se expresa y secreta como apoLf en forma constitutiva en células epiteliales del tracto gastrointestinal, respiratorio, en glándulas exocrinas (lagrimales y salivales) o bajo control hormonal, en el tracto genito-urinario y glándulas mamarias [28]. Dependiendo del sitio de secreción, la Lf está presente en fluidos que recubren las superficies mucosas como mucus intestinal, heces, secreciones naso-bronquiales, genito-urinarias, lágrimas, saliva, y es particularmente abundante en leche y calostro [28]. De acuerdo a la especie animal y el estado fisiológico (lactancia, por ejemplo), los niveles de Lf en diversos fluidos biológicos varían. En el caso particular de la leche, los seres humanos poseen la mayor concentración de Lf en relación con los bovinos, en tanto que, en algunas especies como el perro, conejo y rata, la Lf está ausente en leche [29]. La Lf está normalmente presente en plasma y deriva de la desgranulación fisiológica de neutrófilos; algunos estudios clínicos revelan que los niveles de Lf pueden aumentar en condiciones de inflamación asociada a infecciones [30]. Ensayos *in vitro* muestran que la Lf tiende a auto-ensamblarse para formar tetrámeros en presencia de iones  $Ca^{2+}$  [31]; *in vivo* dicha polimerización podría afectar la actividad de la Lf, pues los tetrámeros son biológicamente inactivos.

La Lf sintetizada y almacenada en los gránulos secundarios de los neutrófilos [32] tiene un efecto protector intra y extracelular. A nivel intracelular, la Lf contribuye en la eliminación de agentes patógenos al estimular los procesos oxidativos bactericidas que ejecutan los neutrófilos durante la fagocitosis [33]. A nivel extracelular, la Lf liberada en sitios de infección tiene un

papel protector contra los daños tisulares causados por especies reactivas de oxígeno liberadas tras ocurrir la desgranulación de los neutrófilos [34]. Por tanto, la Lf almacenada o liberada por los neutrofilos en la sangre y/o en los sitios locales de infección, contribuye en mecanismos innatos de defensa y de neutralización del efecto dañino de especies reactivas de oxígeno

## **B. Estructura y propiedades físico-químicas**

La bLf es una glicoproteína monomérica de 689 aminoácidos, que tiene un peso molecular de 80 kDa. La estructura terciaria de la bLf consiste en dos lóbulos N y C unidos entre sí por una cadena corta de tipo alfa hélice conocida como región bisagra [35]. Los lóbulos N y C están, a su vez, organizados en dos dominios globulares N1-N2 y C1-C2, respectivamente. Las secuencias que forman los cuatro dominios son: N1 (1-90 y 251-333) N2 (91-250), C1 (345-431 y 593-676) y C2 (432-592). La cadena alfa conecta a los dos lóbulos N y C entre los residuos 334-344. Entre cada dominio N1-N2 y C1-C2 existe un nicho formado de un Asp, dos Tyr y una His en donde un ión férrico [ $\text{Fe}^{3+}$ ] junto con un ión carbonato [ $\text{CO}_3^{2-}$ ] se unen reversiblemente a la Lf. Los ligandos de unión a  $\text{Fe}^{3+}$  en el lóbulo N son el Asp60, Tyr92, Tyr192 e His253 mientras que en el lóbulo C son el Asp395, Tyr433, Tyr526 e His595. Por su capacidad de captar en forma reversible iones férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ), la Lf presenta una forma libre (apoLf) y otra asociada a hierro (holoLf). En la bLf, los residuos de Asn-233, 281, 368, 476 y 545 representan los cinco sitios potenciales de glicosilación con los azúcares *N*-acetil-lactosamina, *N*-acetil-glucosamina, galactosa, fucosa, manosa y ácido neuramínico [35].

Aunque la Lf puede captar otros cationes como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  exhibe una mayor afinidad por el  $\text{Fe}^{3+}$  ( $K_a$  de  $10^{-20}$ ) en un rango amplio de pH, pero lo libera a pH menor a 3. La Lf se caracteriza por ser una molécula altamente catiónica con punto isoeléctrico entre 9.4-9.5. La bLf posee una alta densidad de carga positiva localizada en la región con la secuencia de aminoácidos 17-41 denominada dominio lactoferricina (Lfcn) localizado en el extremo N1 [36]. La Lfcn puede ser obtenida en su forma libre por la proteólisis enzimática de la Lf parental con

pepsina. La Lfcn carece de actividad quelante de los iones  $Fe^{3+}$  pero al igual que la Lf parental, Lfcn es una molécula multifuncional con actividad inmunoreguladora y antimicrobiana [37]

### **C. Efectos antimicrobianos in vitro**

Uno de los primeros mecanismos antibacterianos atribuidos a la Lf se basa en su capacidad de inhibir la multiplicación de las bacterias al captar el hierro esencial para su crecimiento. Este efecto antibacteriano indirecto ha sido observado con apoLf. La holoLf exhibe escasa actividad antibacteriana e incluso, puede ser utilizada por algunas bacterias como fuente de hierro [38]. En ensayos con bacterias Gram negativas como S. typhimurium, Escherichia (E.) coli, Klebsiella (K.) pneumoniae [21,22,23,39,40,41] y Gram positivas (Staphylococcus (S.) aureus) [42] reportan que la Lf libre de hierro actúa como bacteriostático y dicha actividad es eliminada tras ser saturada con hierro. Así mismo, ensayos in vitro en cultivos de células HeLa infectadas intracelularmente con Legionella (L.) pneumophila muestran que el efecto bacteriostático de la apoLf es inhibido en presencia de hierro [14]. Otros estudios con Streptococcus (S.) mutants, Vibrio (V.) cholerae [43] E. coli enterotoxigénica (ETEC) [44] y L. pneumophila [45] reportan que la apoLf exhibe, en cambio, actividad bactericida, la cual es bloqueada en presencia de hierro. Pese a que la bacteriostasis o la actividad bactericida de la Lf podrían depender del tipo de cepa ensayada, la carga del inóculo y la concentración de Lf, no son el resultado de la simple privación de hierro. En estudios con S. mutants la actividad bactericida de la apoLf atribuida a la inhibición metabólica de la glucosa y la síntesis de ácidos nucleicos, no es simplemente el resultado de la privación de hierro, pues su eliminación con  $MgCO_3$  no afecta la viabilidad bacteriana [46]. En apoyo a lo anterior, otros estudios con bLfcn muestran que esta molécula, a pesar de ser incapaz de captar hierro, posee actividad bactericida sobre E. coli y Bacillus (B.) subtilis al inhibir la síntesis de ácidos nucleicos, tras ocurrir su unión sobre la superficie bacteriana y su internalización [47]. Lo anterior sugiere que la apoLf posee una configuración que favorece su contacto directo y que es esencial para la actividad antibacteriana sin importar si tal actividad funciona a través de la adquisición de hierro [44]

La actividad antibacteriana directa de la Lf se basa en su capacidad de unirse a componentes de la superficie de bacterias Gram positivas como ácido lipoteicoico (LTA) [15] y de Gram negativas como porinas [16,48] y lipopolisacárido (LPS) [17]. Bajo esta premisa la Lf exhibe efectos antibacterianos contra una gran diversidad de bacterias como Staphylococcus epidermidis [15], E. coli, S. typhimurium [16, 21,22], V. cholerae [23] y V. parahaemolyticus [49]. El mecanismo subyacente sugiere que la unión de la Lf con la bacteria induce la desorganización estructural de componentes de sistemas de transporte que mantienen integra la permeabilidad de la superficie bacteriana. Evidencias experimentales sugieren que más que actuar como bacteriostático o bactericida, la Lf es un agente permeabilizante al competir con los iones  $Ca^{2+}$  asociados a componentes aniónicos de la superficie bacteriana como el LPS. Al desplazar a los iones  $Ca^{2+}$ , la Lf induce la liberación del LPS y como resultado altera la permeabilidad de la superficie bacteriana [50]. Dicha acción permeabilizante de la Lf ha sido involucrada en favorecer el efecto de la lisozima contra S. epidermidis [15], E. coli, S. typhimurium [21] y V. cholerae [23], al permitir su penetración a través de la superficie hasta interactuar con la mureína que forma la pared celular, para después degradarla. Adicionalmente, gracias a su efecto permeabilizante, la Lf potencia la susceptibilidad bacteriana de agentes antibióticos hidrofóbicos al aumentar su accesibilidad hacia los blancos de acción [22, 51, 52].

Otros efectos antibacterianos atribuidos a la Lf evaluados en cultivos de líneas celulares, incluyen su capacidad de inhibir la adherencia de S. typhimurium [24], E. coli enteropatógena (EPEC) [53], Shigella [54] y ETEC[55], o la invasión del estreptococo A [56] y de Shigella (S.) flexneri [54, 57]. Un mecanismo propuesto sugiere que la Lf es una molécula con actividad proteolítica que le permite degradar factores de virulencia involucrados en la adherencia, por ejemplo, de Haemophilus (H.) influenzae [58] o en la invasividad, como en el caso de EPEC [59] y S. flexneri [60].



En resumen, los mecanismos de acción antibacteriana de la Lf son de tipo indirecto, dependientes de su capacidad de captar hierro, y directos, que involucran su interacción con: componentes bacterianos o cationes asociados a estos últimos como iones  $\text{Ca}^{2+}$  para alterar la permeabilidad de la superficie bacteriana o bien con factores de virulencia involucrados en la adherencia o la invasividad bacteriana para después llevar a cabo su degradación.

### **3.2 Efectos de la lactoferrina sobre células inmuno-competentes**

La Lf exhibe efectos inmuno-reguladores a nivel intestinal y sistémico, evaluados al ser administrada por vía oral [61, 62] para distribuirse en órganos sistémicos como el bazo e hígado, tras ser absorbida en el intestino y llegar a la circulación sanguínea [62]. La Lf es altamente resistente a la proteólisis enzimática y por lo tanto puede ser internalizada prácticamente en forma intacta al interactuar con receptores presentes en el borde en cepillo de enterocitos del epitelio intestinal [63], como es el caso de la intelectina [64]. Aunque se asume que la Lf ejerce su actividad moduladora mediante contacto directo celular, no se conocen con certeza los mecanismos involucrados en su internalización en las placas de Peyer o bien su transporte hacia la lámina propia intestinal, para interactuar con células inmuno-competentes como en el caso de los linfocitos T presentes en lámina propia [65].

La Lf es una molécula con actividad inmunoreguladora, entendida ésta como la capacidad de afectar positiva o negativamente la actividad de células inmuno-competentes, como células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas) [10] y linfocitos Th1/Th2 [11]. La actividad inmunoreguladora de la bLf sobre la respuesta local y sistémica de anticuerpos y sobre los linfocitos implicados en su generación, vía secreción de linfocinas, ha sido analizada en forma limitada en ratones. Ensayos in vivo muestran que la bLf administrada por intubación intragástrica (ig) en ratones sanos por cuatro [12] o seis semanas [13], induce el aumento de la producción total o específica de anticuerpos IgA e IgG, presentes en las secreciones intestinales y suero; así mismo, induce el incremento de células que secretan IgA e IgG total y específica en placas de Peyer y bazo.

La actividad de la bLf sobre la producción de anticuerpos se ha atribuido a su capacidad de afectar la función de linfocitos Th1 y Th2 implicados junto con los linfocitos Th3, Th17 y los linfocitos T reguladores inducibles (iTreg) en la modulación de las respuestas inmunitarias adaptativas humoral y celular [66]. En ratones sanos se demostró que la bLf administrada por vía IG promueve una respuesta mixta Th1 y Th2 relacionadas por el incremento de IgG2a e IgG1 respectivamente, en suero, aunque este incremento no se observó en secreciones intestinales. En cultivos celulares de placas de Peyer y bazo de ratones sanos tratados por vía ig, se observó que la bLf favoreció la respuesta Th2 evidenciada por la producción de interleucina (IL)-4 e IL5 [13] además de promover la proliferación de linfocitos T CD4+ [11]. En bazo, la bLf también estimuló la respuesta Th1 al promover la producción de IL-2 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) [13]. Otros ensayos muestran los efectos de la bLf administrada por vía oral en ratones sanos sobre la producción mixta de ILs Th1 y Th2. Estos efectos se relacionan con su capacidad de estimular la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 por linfocitos T reguladores de origen tímico con receptor de tipo  $\alpha/\beta$  presentes en el compartimento intraepitelial de linfocitos y en los ganglios mesentéricos linfoides [67]. Estas evidencias señalan que la influencia de la bLf sobre la inmunidad intestinal no puede basarse simplemente en el contexto del balance Th1/Th2 sino que involucra también a linfocitos T reguladores.

Además de influir en componentes de la respuesta adaptativa, la bLf t aumenta la expresión de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\beta$  e IL-12p40 [68] y estimula la producción intestinal de IL-18 [69], una citocina pro-inflamatoria considerada como un eslabón entre la respuesta innata y la adaptativa [70]

En ensayos in vitro (en cultivos celulares) se han explorado algunos mecanismos mediante los cuales la Lf ejerce su actividad moduladora mediante la cual aumenta o reduce: la activación celular, la expresión de moléculas de superficie y la producción de mediadores solubles que participan en la resistencia innata y en la respuesta inmunitaria adaptativa (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Algunos efectos in vitro de la Lf sobre células inmunocompetentes**

Función	Efecto	Origen	Tipo celular	Ref
expresión de MHC-II	aumento	bLf	macrófagos murinos	<b>71</b>
producción IL-12, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$			infectados con BCG y sin infectar	<b>72</b>
expresión CD40 TLR-4 dependiente	aumento	bLf	macrófagos murinos	<b>73</b>
expresión de CD80, IL-8 IL-6, IL-10, CCL20	aumento reducción	hLf	CD humanas	<b>74</b>
producción de TNF $\alpha$ , IL-10, -12, -6, 1- $\beta$	reducción	bLf	CD murinas	<b>75</b>
presentación de Ag, maduración, prolif	aumento	hLf	cel B ratón neonato	<b>76</b>
activación inducida por oligonucleótido CpG	reducción	hLf	cel B humanas	<b>77</b>
cambio CD4-CD8- a CD4+ (helper)	inducción	hLf	timocitos murinos	<b>78</b>
Th1 prolif, citocinas, expresión IL-2R	reducción	bLf, hLf	cél T	<b>79</b>
Th2 prolif citocinas expresión IL-4R	sin afectar	bLf, hLf	cél T	<b>79</b>
expresión CD4	aumento	hLf	cél T	<b>80</b>

CD: células dendríticas

Como se muestra en el Cuadro 1, la Lf posee efectos moduladores divergentes, que dependen en parte, de la amplia variedad estructural de receptores de Lf ubicuamente expresados en linfocitos, monocitos, hígado y plaquetas, por mencionar algunos, como se muestran en el **Cuadro 2 [81]**.

**Cuadro 2. Algunos receptores para Lf en células de mamíferos [81]**

Tejido	Especie	Nombre	ligand o	PM (kDa)	Glicanos (kDa)
intestino delgado	Infante humano	intelectina	hLf	37	4
intestino delgado	ratón	intelectina	mLf	34	
intestino delgado	ratón		hLf	130	25
intestino delgado	conejo		hLf	105	
hígado	rata	LRP	hLf	600	
hígado	rata	ASGPR	bLf	45	
monocitos	humano	CD14	hLf	55	
linfocitos	humano		hLf	100,1 10	
Línea celular linfocitos Jurkat	humano		hLf	105	
plaquetas	humano		hLf	105	
fibroblastos	humano	LRP	bLf	600	
hueso	humano	LRP	bLf	600	
cerebro	bovino	LRP	bLf	600	

LRP: proteína relacionada al receptor de Low density Lipoprotein (LDL)

ASGRP: receptor de asialoglicoproteína

Se ha sugerido [82] que la acción moduladora de la Lf ocurre al activar vías de señalización intracelular tras unirse a nivel extracelular con receptores de superficie [73] [74, 80, 83], y/o influir en la regulación transcripcional génica [84, 85] al interactuar con receptores que favorecen su endocitosis e internalización para después translocarse hacia el núcleo e interactuar con ADN nuclear [86, 87]

### 3.3 Efecto de la lactoferrina en modelos animales de infección

Diversos estudios en modelos animales de infección experimental muestran que la Lf ejerce efectos protectores relacionados con la supervivencia del hospedero, la resolución de los síntomas y la disminución de la carga tisular de patógenos. Así mismo, en infecciones

causadas por bacterias extracelulares o intracelulares, la Lf favorece la reducción o el aumento respectivamente, de la inflamación asociada a la resistencia antibacteriana.

Como puede observarse en el **Cuadro 3**, bajo condiciones fisiológicas algunos mecanismos de protección atribuidos a la Lf se relacionan con su capacidad para bloquear la adherencia bacteriana de ETEC en intestino [88], de Helicobacter pilory en estómago [89] y de Listeria monocitogenes en hígado [90]. En otros casos, el efecto protector de la Lf contra cepas de E. coli causantes de infecciones intestinales y meningitis ocurrió tras activar los efectos bactericidas intracelulares de fagocitos [91, 92]; dicho incremento de la actividad fagocítica ha sido observado en ensayos in vitro con macrófagos [93] y neutrófilos [94]. Así mismo, la protección conferida por la Lf ha sido asociada a la disminución de la inflamación tisular causada por Shigella flexneri [95]. A diferencia del aumento inducido por la bLf sobre la producción de INF- $\gamma$  en ratones sanos [13], la acción moduladora de la Lf sobre la respuesta inflamatoria en infecciones causada por Listeria monocitogenes y E. coli uropatógena ocurre al reducir la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  [90] e IL-6 [96].

Con base en evidencias obtenidas en ensayos de infección, la influencia de la Lf sobre la protección contra la respuesta inflamatoria de origen infeccioso, está relacionada con su capacidad de participar en la maduración y diferenciación de linfocitos Th1/Th2 y por ende, en el balance de citocinas [11]. Se ha sugerido que al ejercer una modulación negativa, la Lf atenúa la producción de citocinas tipo Th1 y limita así las consecuencias negativas de una excesiva respuesta inflamatoria; esta última, ocurre durante la sepsis generada en infecciones bacterianas y es causante de daño tisular a nivel sistémico y local [97]. En contraparte, a través de la modulación positiva, la Lf promueve la respuesta Th1 en infecciones cuyo control depende de las citocinas producidas por esta subpoblación [11]

En relación a lo anterior, los modelos de infección muestran que la Lf favorece la polarización de la respuesta mediada por linfocitos Th1, que tienen un papel central en el control de infecciones causadas por Mycobacterium tuberculosis. El incremento de la respuesta Th1

reflejado por el aumento de citocinas proinflamatorias IL-12, TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6, se observó en ratones inmunizados con la vacuna BCG [Bacilo Calmette-Guerin, bacilos de Mycobacterium bovis muertos por calentamiento] adicionada con bLf como adyuvante, e infectados con Mycobacterium tuberculosis. [98]

**Cuadro 3. Algunos efectos protectores de la Lf en modelos animales de infección con diversas bacterias patógenas**

Bacteria	Modelo de infección	Tratamiento con Lf	Efecto	Ref
ETEC [enterotoxigenic <u>Escherichia (E.) coli</u> ]	infección ig en ratón ICR libres de patógenos	bLf 10 mg/mL <i>ad libitum</i> en sol. de beber 7 días antes de infectar	inhibición de adherencia bact. intestinal, efecto antimicrobiano	88
<u>Helicobacter pylori</u>	infección ig en ratón BALB/cA	bLf 400 mg/kg diarios por 10 días, 4 semanas después de infectar	reducción de colonización, efecto anti-inflamatorio	89
<u>Listeria monocytogenes</u>	infección oral en ratón Balb/C	en el día 4 después de infectar, Lfh 10 y 100 mg/kg por 7 días	protección vs: colonización hepática, necrosis, inflamación	90
ETEC	infección sistémica por vía iv en ratón CFW, CBA	bLf 10 mg iv dosis única un día antes de infectar	aumento fagocitosis	91
<u>E coli</u> Ec5 (O18:K1:H7) causante de meningitis neonatal en ratas	infección ig en ratas recién nacidas Sprague Dawley	rhLf 350 mg / kg /día 2 días antes de infectar	efecto bactericida, activación de macrófagos	92
<u>Shigella flexneri</u>	infección ig en conejo New Zealand	hLf 0.125 mM <i>ad lib</i> en PBS para beber, después de infectar	protección vs inflamación por enteritis aguda	95
<u>E.coli</u> O6K5 causante de pielonefritis infantil aguda	instilación en vejiga urinaria de ratón C3H/Tif, C3H/HeN	500 $\mu$ g Lfb o hLf 30 min antes de infectar por vía oral	inhibición IL-6 efecto: bactericida, anti-inflamatorio	96

bLf: lactoferrina bovina, hLf: lactoferrina humana, rLf: lactoferrina recombinante humana

iv: vía intravenosa, ig: vía intragástrica,

En el caso particular del entero-patógeno intracelular causante de diarrea en humanos S. typhimurium, la actividad de la Lf ha sido explorada en un número limitado de ensayos in vitro [16, 21, 22, 23, 24, 25] e in vivo [26, 27].

**Cuadro 4. Efectos de la Lf sobre S. typhimurium**

origen	modo de acción	Ref
bLf	efecto bacteriostático, aumento de permeabilidad, liberación de OMPs ,	16
bLf, hLf	efecto bacteriostático, aumento de permeabilidad, liberación de LPS	21,22
hLf	aumento del efecto bactericida de lisozima,	23
hLf	desestabilización de membrana externa por competencia con Ca <sup>2+</sup>	50
hLf	bloqueo de adherencia tisular en células HeLa	24
Lf	favorece estallido respiratorio en macrófagos al aumentar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25
hLf	aumento de virulencia en ratones tratados ip con hLf y retados vía im	26
bLf	reducción de inflamación severa, necrosis y mortalidad en ratones	27

Como se puede ver en el Cuadro 4 en ratones tratados intraperitonealmente con hLf y más tarde infectados por vía intramuscular con S. typhimurium, la hLf estimuló la virulencia [27], mientras que en ratones tratados por vía ig con bLf e infectados por la misma vía, la bLf redujo inflamación severa, necrosis y mortalidad [28].

Aunque estos resultados contradictorios sobre la influencia de la Lf en la protección contra la infección causada por S. typhimurium podrían reflejar diferencias en el diseño experimental, pueden ser derivar en parte de las propiedades modulador positivas o negativas de la Lf componentes de la respuesta inmunitaria.

### 3.4 Patogénesis de Salmonella typhimurium en ratón

El género Salmonella, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, agrupa a bacilos Gram negativos, flagelados, móviles, no esporulados, e incluye a dos especies: S. bongori y S. enterica. Esta última, se subdivide en las subespecies asignadas con números romanos I al VII [99]. Mientras que S. bongori y las subespecies II-VII de S. enterica infectan vertebrados de sangre fría como reptiles, la subespecie I es patógena en aves y mamíferos. La subespecie I de S. enterica incluye a la

serovariedad Salmonella typhimurium que es el agente causal de gastroenteritis humana cuyos síntomas incluyen diarrea, vómito y dolor abdominal [100]. En cepas de ratones naturalmente susceptibles como Balb/C [101], S. typhimurium no causa diarrea sino que genera una infección intestinal y extraintestinal similar a la tifoidea humana; por ello, la infección murina con S. typhimurium suele aplicarse como modelo experimental para estudiar la patogénesis de la fiebre tifoidea producida por S. typhi en humanos [100].

Salmonella typhimurium se transmite en forma natural por ingestión y por ello la ruta de infección murina por vía oral se aplica para evaluar sus efectos a nivel local y sistémico. La infección oral en ratones muestra que al pasar del estómago hacia el intestino, S. typhimurium se adhiere y coloniza las vellosidades del epitelio intestinal y las placas de Peyer [102] antes de invadir el compartimento sistémico. La fase de colonización intestinal involucra la participación de algunos componentes asociados a la virulencia como ShdA, una proteína de membrana externa de unión a la fibronectina intestinal [103], fimbrias codificadas en los operones fim, lfp, pef y agf [104]; otro determinante de virulencia, el factor de transcripción codificado en la isla de patogenicidad 1 de Salmonella (SPI-1) HilA [105]. Este último, regula la expresión de diversas proteínas de secreción de tipo III codificadas en SPI-1 [106] involucradas en la invasión y sobrevivencia intracelular del patógeno. Otros factores de colonización incluyen a moléculas orgánicas de bajo peso molecular conocidas como sideróforos, secretados por la bacteria para la adquisición de hierro esencial para su crecimiento y sobrevivencia intestinal [107].

Tras colonizar, S. typhimurium invade la porción terminal del ileum [108] preferencialmente, a través de las células M que recubren las placas de Peyer [109]. Algunas estructuras recubiertas por células M, como los folículos linfoides aislados, son una ruta alternativa de invasión de S. typhimurium [110]. Los cambios patológicos causados por la invasión bacteriana incluyen el agrandamiento de las placas de Peyer, engrosamiento de la mucosa ileal, enteritis en intestino delgado, caracterizada por infiltración de leucocitos predominantemente mononucleares, edema y acortamiento de vellosidades [100]. La invasión de los enterocitos es otra ruta mediante la cual S.



typhimurium atraviesa el epitelio hasta llegar a la región subepitelial en donde puede ser captada por fagocitos [111].

Al invadir, S. typhimurium causa el "ruffling" un evento que desorganiza la superficie de enterocitos y células M y favorece la captura e internalización de este patógeno dentro de vesículas. A diferencia de los enterocitos, sólo las células M son destruidas en respuesta a la invasión [109]. La destrucción de células M ha sido atribuida al gene slxA [112] mientras que los genes requeridos para la invasión de células M y enterocitos están mapeados en el operon lfpC, invA [113] y en SPI-1 [106], esta última codifica proteínas de secreción tipo III (TTSII) causantes del "ruffling".

Otra vía alternativa de entrada a través del epitelio intestinal de S. typhimurium consiste en la captura luminal y translocación por células dendríticas [111]. Estas últimas, son atraídas por la quimiocina CCL20 a la región subepitelial del intestino, en tanto que la quimiocina CX3CL-1 estimula el alargamiento de las dendritas hasta alcanzar la región luminal al separar las uniones fuertes paracelulares del epitelio [114]. La invasión a nivel del epitelio intestinal de S. typhimurium trae consigo una respuesta inflamatoria inducida por la flagelina [115], tras interactuar con el receptor tipo toll 5 (TLR-5).

Al completar la penetración del epitelio intestinal, S. typhimurium llega a la región subepitelial donde puede invadir e infectar fagocitos incluidos macrófagos y células dendríticas. La sobrevivencia y multiplicación intracelular son atributos de la virulencia de S. typhimurium y están ligados a los genes phoP/phoQ y productos génicos de la isla SPI-2 [111]. pho codifica a un factor de transcripción que controla la expresión génica en respuesta a señales del medio ambiente detectadas por PhoQ mientras que la SPI-2 codifica proteínas de secreción tipo III [111]. Como resultado de la invasión intracelular, S. typhimurium puede causar apoptosis en fagocitos mediante la proteína SipB codificada en SPI-1, evento que induce la generación de citocinas pro-inflamatorias IL-1b e IL-18 que atraen a más fagocitos al sitio de infección [116]

Tras alcanzar la región subepitelial del intestino, S. typhimurium puede iniciar la invasión intra y/o extracelular por vía sanguínea o linfática. La primera ruta implica el transporte intracelular de S.

typhimurium por fagocitos mononucleares CD18+ que pasan directamente a la sangre para diseminarse hasta el compartimento sistémico [117]. La segunda vía que no se sabe con certeza si es extra o intracelular, se inicia cuando S. typhimurium presente en las placas de Peyer se dirige a través de los linfáticos eferentes hacia los ganglios linfoides mesentéricos [118] y de ahí hacia el conducto torácico para pasar a la sangre y diseminarse hacia órganos del compartimento sistémico como el bazo e hígado [108]. La propagación sistémica puede ser favorecida por S. typhimurium al subvertir la función protectora de componentes de la respuesta innata, ya que puede utilizar células dendríticas CD11c+ TLR5+ presentes en lámina propia para transportarse hacia los ganglios mesentéricos linfoides [119].

En la sangre, S. typhimurium se dirige hacia el bazo e hígado que son sus principales órganos blanco de diseminación del sistema reticulo endotelial (RES). En estos órganos ocurre una rápida multiplicación bacteriana que deriva en hepatomegalia y esplenomegalia. El crecimiento bacteriano inicial genera abscesos agudos que contienen predominantemente leucocitos polimorfonucleares (PMN). Estas lesiones tempranas aumentan en el transcurso de la infección y posteriormente se transforman en lesiones granulomatosas con necrosis central y leucocitos mononucleares periféricos [100]. La formación de las lesiones es crucial para confinar a la bacteria en estos focos de infección y evitar así su diseminación incontrolada a otros tejidos. De hecho, la falla en la formación de las lesiones genera un crecimiento bacteriano anómalo y la propagación de la bacteria en los tejidos infectados [120]. En estas lesiones, S. typhimurium reside intracelularmente en macrófagos, células dendríticas, leucocitos PMN y células B [121]. En hígado, S. typhimurium causa desarreglo del parénquima, hipertrofia, destrucción de hepatocitos y focos inflamatorios por infiltración de PMN. En el estadio inicial de la infección hepática, S. typhimurium se localiza en leucocitos PMN mientras que en la infección tardía reside intracelularmente en macrófagos [122]. El crecimiento tisular de S. typhimurium resulta del incremento en el número de células infectadas, aunque la multiplicación bacteriana intracelular es baja. Cuando el crecimiento bacteriano tisular es elevado, una proporción de S. typhimurium se localiza transitoriamente en el espacio extracelular [121].

El éxito de la infección sistémica de S. typhimurium radica en la sobrevivencia intracelular atribuida a algunos productos codificados en SPI-2 que interfieren en la fusión de vesículas que contienen enzimas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROI) [123] y nitrógeno (RNI) [121] con fagosomas de fagocitos. Así mismo, otro efecto de SPI-2 en la sobrevivencia de S. typhimurium es la evasión de la respuesta inmune adaptativa, al prevenir la presentación antigénica de células dendríticas [124]. Ensayos con dosis infectantes bajas muestran que S. typhimurium, evade la activación de células T CD4+ específicas hacia flagelina [125]. En contraparte, ensayos con dosis letalmente altas de infección, sugieren que la muerte sobreviene cuando la carga bacteriana tisular alcanza el orden de  $10^8$  CFU y se libera lípido A durante la multiplicación bacteriana [126]. Como se sabe, el lípido A es un inductor de citocinas proinflamatorias cuya exagerada producción causa una potente respuesta inflamatoria sistémica asociada a sepsis y a falla multi-orgánica letal para el organismo [97].

Por lo anterior, se puede decir que S. typhimurium cuenta con estrategias para causar daño tisular y/o para evadir mecanismos de defensa innatos y adaptativos que favorecen su diseminación y/o sobrevivencia tisular. En contraparte, la interacción de S. typhimurium con tejidos o células del hospedero, desencadena mecanismos de respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa involucrados en el control de la infección a nivel local y sistémico descritos a continuación.

### **3.5 Respuesta inmune intestinal contra Salmonella typhimurium en ratón**

Durante las fases de colonización, invasión y eliminación bacteriana, diversos mecanismos de respuesta innata y adaptativa colaboran sincronizadamente para el control de la infección a nivel intestinal causada por S. typhimurium. En la fase temprana de la infección oral, S. typhimurium desencadena la generación de mecanismos de respuesta innata mediados por citocinas [127] y fagocitos [128]; estos componentes son esenciales para limitar el crecimiento de S. typhimurium durante el proceso inicial de colonización y/o invasión intestinal. Además de los antes mencionados, otros componentes de defensa innata contra S. typhimurium incluyen a la flora microbiana que limita la proliferación del patógeno y su transmisión [129], así como péptidos intestinales antimicrobianos

[130]. Otros componentes de defensa innata como los receptores tipo Toll (TLR)-4[131] [132] y -5 [115] que interaccionan con el lípido A y la flagelina, respectivamente, inducen la expresión de mediadores de la respuesta inflamatoria temprana contra S. typhimurium. Estos últimos incluyen a factores quimiotácticos como las quimiocinas CXCL2, CXCL3 [132] que actúan sobre neutrófilos, macrófagos y células dendríticas para atraer y dirigir su migración al sitio de infección [133] o regulan la secreción de TNF e IL-6 como CCL2 [134]. Algunos componentes de la respuesta no específica como el óxido nítrico (NO) [135] y Nramp1 [136] son esenciales para controlar el crecimiento intracelular de S. typhimurium en las primeras etapas de la infección. El NO es un agente antimicrobiano producido en fagocitos por la enzima citosólica sintasa inducible de NO (iNOS) a partir de la oxidación de la L-arginina [137] mientras que Nramp1 es una proteína integral de la membrana de fagosomas de macrófagos que funciona como bomba de cationes divalentes y es esencial para controlar eficientemente la multiplicación intracelular de patógenos [138]. Una amplia variedad de células como los neutrófilos, células asesinas naturales, macrófagos y células dendríticas presentes en el intestino, constituyen una fuente primaria de citocinas pro-inflamatorias como el IFN- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , e IL-12 [128]. La acción concertada de citocinas como el TNF [139], IL-1 $\beta$  [140] IFN- $\gamma$  [141], y citocinas que regulan la producción de IFN- $\gamma$  como IL-12, [127] e IL-18 [140] [142], favorece la actividad bactericida de fagocitos y de ese modo contribuye a limitar la proliferación bacteriana intracelular en la fase aguda de la infección. Sin embargo, durante este proceso algunas citocinas como el TNF- $\alpha$ , son responsables de inducir daño tisular causado por fagocitos involucrados en la inflamación [139]. De acuerdo a lo anterior, la etapa inicial se caracteriza por el reclutamiento y activación de fagocitos en respuesta a la inflamación de los sitios de infección tisular y a la producción de citocinas producidas por una gran variedad de células.

Mientras que la respuesta innata está involucrada en la defensa temprana al restringir el crecimiento bacteriano inicial de S. typhimurium [128], la inmunidad adaptativa participa en la defensa tardía enfocada a la erradicación de las bacterias que remontaron los mecanismos innatos y a generar la memoria inmunológica contra una infección ulterior [114]. En esta transición, las células

dendríticas tienen un papel esencial en el enlace entre las respuestas innata y adaptativa. Lo anterior se relaciona con la capacidad de las células dendríticas de llevar a cabo la primo-activación de linfocitos T CD45RA “vírgenes” vía presentación antigénica [143]. Este evento precisa de la maduración de las células dendríticas que puede estar mediada por receptores de patrones de reconocimiento (PRRs), cuyos ligandos son componentes bacterianos [144] y/o por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  secretadas localmente por fagocitos [143]. Al madurar, las células dendríticas aumentan la expresión de moléculas de clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) I y de moléculas coestimuladoras CD40, CD54, CD80 y CD86. Durante la fagocitosis, los macrófagos y sobre todo las células dendríticas CPH-II+ y CPH-I+, inician la respuesta adaptativa al procesar y presentar antígenos a los linfocitos T CD4 cooperadores (Th) y Tc CD8 citotóxicos (Tc) [116, 143] con fenotipo CD45RA+. En células dendríticas, S. typhimurium induce la presentación de antígenos asociados a CPH-I y CPH-II que resulta de la invasión y el pasaje de la bacteria a través de vesículas endosomales ácidas [116] en donde se generan péptidos bacterianos. Estos últimos forman complejos con moléculas CPH-II tras la fusión de vesículas con endosomas egresados del aparato de Golgi. Los péptidos presentes en vesículas pueden asociarse con moléculas CPH-I, al “desbalagarse” al citosol para ser procesados en proteosomas y transportados al retículo endoplásmico rugoso vía TAP [116]. Por tanto, en la infección murina por S. typhimurium ambas poblaciones de linfocitos Tc y Th son activadas, tras llevar a cabo el reconocimiento antigénico a través de su receptor de péptidos asociados a CPH-I y CPH-II, respectivamente. Varios estudios *in vivo* muestran la activación linfocitaria en respuesta a la infección luminal de S. typhimurium, que ocurre bajo condiciones específicas del microambiente intestinal. Existe una subpoblación de células dendríticas CCR6+ que expresan el receptor de la quimiocina CCL20 presentes sólo en placas de Peyer, involucrada en la activación de linfocitos Th CD4+ específicos[145]. Tras activarse en las placas de Peyer, los linfocitos Th CD4+ migran preferencialmente a los ganglios mesentéricos linfoides y en menor proporción se dirigen al bazo. Lo anterior muestra que la infección oral con S. typhimurium genera una respuesta localizada en compartimentos del tejido linfoide asociado a

mucosas pero no se extiende eficientemente a órganos sistémicos [146]. Esta respuesta inmunitaria circunscrita al intestino podría derivar de cambios en la expresión antigénica de S. typhimurium en sus fases extra- e intracelular. Ensayos in vitro de presentación específica de antígenos flagelares sugieren que las células presentadoras activadas tempranamente en el intestino que originalmente procesaron antígenos flagelares de S. typhimurium en su fase extracelular no estimulan a linfocitos T al migrar al bazo, ya que éstos se activan por células presentadoras que tardíamente procesan antígenos flagelares cuando S. typhimurium esta en su fase intracelular [147].

El papel de los linfocitos Tc CD8+ en la resistencia contra S. typhimurium no es muy conocido aunque podría estar relacionado con su capacidad de secretar IFN- $\gamma$  y así contribuir en la activación de fagocitos; junto con los linfocitos Th CD4+, las células Tc CD8+ colaboran en la respuesta celular vs la translocación intestinal de S. typhimurium hacia los órganos sistémicos [148]. En relación a la población Th, se ha visto que la infección oral con S. typhimurium se caracteriza por estimular la activación de linfocitos predominantemente de la subpoblación Th1 que regulan la producción de IgG2a sérica [149] y la activación de fagocitos involucrados en la respuesta celular [116] a través de la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-12 [150]. Salmonella typhimurium induce además, la activación de un subtipo de linfocitos Th2 presentes sólo en placas de Peyer. Este subtipo Th2 a pesar de no secretar IL-4 ni IL-5 induce la producción de IgA mediante la secreción de IL-6 e IL-10 [149, 150]. Lo anterior sugiere que mediante la secreción de ILs, los linfocitos Th1 y el subtipoTh2 activados por S. typhimurium regulan la respuesta celular mediada por fagocitos y la humoral mediada por la IgA requeridas para la erradicación intestinal del patógeno.

La invasión de S. typhimurium a través de las placas de Peyer es determinante para la producción intestinal de IgA secretora (slgA) [151, 152]. La slgA tiene un papel protector sobre todo en la fase extracelular de S. typhimurium, al contribuir en mecanismos de exclusión inmune, que conducen a la erradicación luminal de S. typhimurium. La protección activa y pasiva de slgA resultante de su participación en mecanismos de exclusión inmune, ha sido reportada en ratones portadores de hibridomas subcutáneos productores de IgA intestinal [153] y en ratones neonatos alimentados con

leche de ratones hembras vacunadas con la mutante avirulenta S. typhimurium Aro<sup>-</sup> e infectadas con S. typhimurium virulenta [154]. La slgA no específica también contribuye en la protección al reducir la diseminación de S. typhimurium entre la población más que en la exclusión inmune [155]. Aunque no se conocen con certeza los mecanismos a través de los cuales la slgA colabora en la resistencia contra S. typhimurium, ensayos *in vitro* muestran que la slgA incrementa la afinidad de S. typhimurium con el mucus intestinal aunque reduce la fagocitosis mediada por IgG [156]. Estos mecanismos podrían (i) impedir el contacto directo de la bacteria con la superficie de la mucosa intestinal y por ende, propiciar su eliminación luminal y (ii) abatir los efectos pro-inflamatorios de la IgG al aumentar la actividad bactericida de fagocitos causantes de daño tisular local [157].

En resumen, S. typhimurium induce la activación de mediadores humorales y celulares de la respuesta inmune adaptativa acotada a nivel local, involucrada principalmente en la erradicación intestinal del patógeno y la limitada diseminación a nivel sistémico resulta de cambios en la presentación de antígenos cuando la bacteria esta en sus fases extra o intracelular [147].

### **3.6 Respuesta inmune sistémica contra Salmonella typhimurium en ratón**

En el curso natural de la infección oral en ratones susceptibles, S. typhimurium puede evadir las respuestas innata y adaptativa intestinales para diseminarse por vía linfática y/o sanguínea hacia órganos del RES [111]. Aunque la infección por S. typhimurium es transmitida en forma natural por vía oral, gran parte de la información sobre la distribución de S. typhimurium en el RES y sus efectos sobre la respuesta inmunitaria ha sido generada en ensayos de infección parenteral. En ratones susceptibles infectados subletalmente, la infección sistémica por S. typhimurium cursa por cuatro fases: 1) depuración sanguínea, 2) crecimiento exponencial, 3) supresión del crecimiento exponencial (fase plateau) y 4) depuración tisular [158]. Entre las fases temprana y tardía ocurre una transición de los componentes de las respuestas innata y adaptativa, respectivamente, que a la larga definen la resolución de la infección por S. typhimurium [158, 159].

En la primera fase, S. typhimurium causa bacteremia transitoria para después ser depurada de la sangre por factores del complemento, como fue descrito en ratones carentes del gen que codifica al

factor C1q [160]. Tras la depuración sanguínea, S. typhimurium llega al bazo y al hígado en donde sobrevive y se replica intracelularmente en neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T [161]. En la primera fase, los neutrófilos colaboran con los macrófagos del RES en la depuración bacteriana sanguínea [162] e inhiben la colonización bacteriana extracelular de la microvasculatura hepática [163]. Además de ser fuentes prominentes de las citocinas inflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF [164], los neutrófilos y macrófagos generan mediadores bactericidas como el ion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) producido enzimáticamente por la fagocito-oxidasa dependiente de NADPH, mejor conocida como Phox [165], cuyo papel es esencial en la siguiente fase 2.

En la fase 2, el control de crecimiento exponencial recae sobre todo en Phox al generar  $O_2^{\cdot-}$  que es precursor de especies reactivas de oxígeno (ROI); éstas son responsables de lo que se conoce como estallido oxidativo, causante de la eliminación intracelular de S. typhimurium por fagocitos [158]. Otro determinante de la fase 2 es el transportador catiónico de la membrana de fagosomas Nramp1. Además de regular el crecimiento intracelular de S. typhimurium, Nramp1 [138] modula la respuesta inflamatoria vía producción de TNF, IL-6 e IFN- $\gamma$  [136] y la expresión temprana del gen IFN- $\gamma$  [166]. Así mismo, Nramp1 actúa sinérgicamente en la resistencia bacteriana con otro determinante innato de defensa, el TLR-4 [167] que tiene un papel esencial en el control del crecimiento exponencial [168]. Junto con el TLR2, TLR4 colabora en la generación de TNF [169], mientras que con TLR-5 contribuye en la resistencia bacteriana [170]. Esta última, podría ser atribuida al carácter pro-inflamatorio de TLR5 pues es un potente inductor de quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP2 y citocinas como TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, [170] esenciales en el establecimiento de la fase 3.

Los componentes que intervienen en el control de crecimiento exponencial de la fase 2 son necesarios para dar paso a la fase 3. Una falla en el control del crecimiento exponencial conduce a la muerte del hospedero por shock séptico [97,126], debido a la endotoxina liberada en la sangre cuando la carga bacteriana es igual o mayor a  $10^8$  UFC.



Los abscesos formados por el influjo inicial de neutrófilos en el RES son reemplazados por fagocitos mononucleares, cuya infiltración coincide con el inicio de la fase 3 caracterizada por la hepatoesplenomegalia y la formación del granuloma [158]. El control de la proliferación bacteriana ejercido por la acción bactericida de ROI en la fase 2, es relevado gradualmente en la fase 3 por la acción bacteriostática de especies reactivas de nitrógeno (RNI) derivadas del NO que a su vez es generado por iNOS [165]. Además de su acción bacteriostática, el NO tiene un efecto citoprotector al reducir la apoptosis inducida por S. typhimurium en células infectadas [171]. La expresión de iNOS ocurre sobre todo en macrófagos que forman focos localizados de infección y es estimulada por TNF, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  [172] e IL-12 [173]. El establecimiento de la fase plateau asociado a la formación del granuloma [158], está determinado por la acción concertada de TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL18 [127]. Estas citocinas pro-inflamatorias tienen funciones aparentemente similares aunque no son redundantes, pues al sinergizar favorecen el abatimiento de la proliferación bacteriana y por ende, la sobrevivencia del hospedero como en el caso del INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [174]. El TNF y la IL-12 tienen un papel esencial en la generación y establecimiento del granuloma, el primero en el reclutamiento de macrófagos [120] y la segunda en su activación [173]. La IL-12 ejerce su efecto a través del INF- $\gamma$  [173], que es responsable inducir la generación intracelular de ROI con acción bactericida y así aumentar la capacidad fagocítica de los macrófagos sobre S. typhimurium [175]. Al igual que la IL-12, la IL-18 es otra quimiocina pro-inflamatoria que afecta funcionalmente a los macrófagos y contribuye a la resistencia vs S. typhimurium [142, 176] al estimular la generación de INF  $\gamma$ . La IL-18 y citocinas como la IL-1  $\beta$  poseen una forma inmadura funcionalmente inactiva, pero pueden ser activadas al pasar por un proceso de maduración enzimática causado por la caspasa1, involucrada así mismo en la resistencia contra S. typhimurium [140]. Aunque la caspasa 1 tiene un efecto protector, puede al mismo tiempo inducir daño tisular por sus propiedades pro-inflamatorias y pro-apoptóticas [116]

Algunos componentes de la respuesta innata como TLR4 [177] y TLR2 [178] favorecen el establecimiento de la fase 3 al estimular la generación de NO. El TLR2 participa no sólo en la fase 3,

sino que también colabora en la fase de eliminación bacteriana (fase 4) [178]. El TLR4 es esencial en la fase 3 al inducir la generación de citocinas pro-inflamatorias que regulan la infiltración de macrófagos e incrementan su actividad bactericida [127,158], aunque su sobre-expresión puede perjudicar la integridad tisular [167]. El papel del TLR4 en la fase de depuración bacteriana no es al parecer crucial [168], no obstante, el TLR4 [177], al igual que otros TLRs [179] e IL-18 [180] actúan como enlace con la respuesta adaptativa al estimular la activación de linfocitos TCD4+ [177] [180] de la subpoblaciónTh1 [179] y así dar inicio a la fase de depuración bacteriana (fase 4).

La transición entre la fase plateau y la fase de depuración bacteriana coincide con la participación de la respuesta inmunitaria específica obligatoria para la erradicación tisular del patógeno [158] y la generación de memoria contra una infección ulterior por S. typhimurium [181]. La depuración bacteriana depende críticamente de células presentadoras de antígeno sobre todo dendríticas, ya que son capaces de inducir la primoactivación de linfocitos T CD45 RA. Esto último involucra la activación de células dendríticas con alta expresión de CD40 y CD86 [182] que interaccionan con los ligandos CD154 (CD40L) [183] y CD28 [184], respectivamente, expresados en linfocitos T. La población de linfocitos T CD4+ con receptor  $\alpha/\beta$  de la subpoblación Th1 [185] caracterizada por la expresión de Tbet [186] es determinante en la fase de eliminación bacteriana que está bajo el control genético del CPH-II [187]. Los linfocitos Th1 ejercen su efecto protector mediante la producción de IFN- $\gamma$  [141], necesaria para la activar la capacidad bactericida de fagocitos [175]. La producción de IFN- $\gamma$  es reforzada por los linfocitos TCD8+ activados en el curso de la infección [188]. Los linfocitos B también contribuyen en la depuración bacteriana sistémica [189] a través de la producción de INF- $\gamma$ , en la presentación antigénica que conduce a la activación de linfocitos Th1 [190] y en la producción de anticuerpos al madurar a células plasmáticas. Junto con los linfocitos TCD4+, los anticuerpos son determinantes de la resistencia contra S. typhimurium en ratones susceptibles BALB/c [184, 191]. Modelos de vacunación muestran que en comparación con vacunas basadas en bacterias muertas, la vacunación con bacterias vivas atenuadas (S. typhimurium Aro<sup>-</sup>) en ratones BALB/c estimula

fuertemente la producción asociada a Th1 de anticuerpos IgG2a vs antígenos proteicos y LPS [192]. En modelos de infección con S. typhimurium atenuada en ratones susceptibles C57BL/6, la respuesta Th1 de anticuerpos séricos IgG2c (equivalentes a IgG2a en BALB/c) está dirigida prominentemente hacia proteínas de membrana externa [193]. En el modelo anterior se observó que en la infección con S. typhimurium atenuada preincubada con suero hay reducción de la colonización bacteriana en bazo y de la diseminación sistémica del patógeno [193]. Este y otros ensayos in vivo [191, 193] sugieren que el mecanismo mediante el cual los anticuerpos colaboran contra la proliferación bacteriana es la opsonización. Aunque los anticuerpos tienen un efecto antibacteriano potencial al llevar a cabo la activación de la vía clásica del complemento, Salmonella es insensible a su efecto lítico [159]. Sin embargo ensayos in vitro muestran que los anticuerpos favorecen la opsonización junto con el complemento [194] y refuerzan la actividad bactericida de fagocitos [195], incluso en la fase temprana de la infección [196].

En breves palabras, se puede decir que en la etapa temprana de la infección sistémica causada por S. typhimurium en ratones susceptibles, las respuestas humoral y celular de la inmunidad innata contribuyen en el control inicial del crecimiento bacteriano y colaboran en el establecimiento de las respuestas adaptativas celular y humoral, necesarias en la depuración bacteriana tisular que ocurre en la etapa tardía de la infección.

## **JUSTIFICACIÓN**

Ensayos in vitro muestran que la Lf exhibe acción antibacteriana contra S. typhimurium. Sin embargo, el efecto antibacteriano de Lf ha sido escasamente explorado en ratones susceptibles a la infección causada por esta bacteria enteropatógena y los dos únicos estudios previos reportan resultados divergentes. El presente trabajo pretende esclarecer si la Lf contribuye o no en el control de la infección intestinal y extraintestinal causada por esta enterobacteria patógena. Las repercusiones prácticas están relacionadas con explorar aplicaciones potenciales de la Lf como agente antibacteriano y/o como modulador de la respuesta inmunitaria en la infección con S. typhimurium.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **A. Animales**

Se utilizaron ratones Balb/C (Harland Sprage-Dawley) machos entre 8-12 semanas de edad y un peso de 25-30 g, los cuales fueron mantenidos a temperatura constante (22-24°C) y un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 7 am). La dieta consistió en Purina Chow de ratón y agua purificada a libre acceso. El manejo de los animales se hizo en conformidad con las regulaciones federales de México para la atención y experimentación animal (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, Ciudad de México, México) y aprobado por el Comité Institucional de uso y cuidado animales.

### **B. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento**

La cepa tipo silvestre de S. typhimurium ( ATCC-14028) fue cultivada en agar cerebro corazón (Difco, Detroit, Michigan) durante 12 horas a 37 ° C. El cultivo bacteriano se colectó con solución salina isotónica (SSI) estéril y la suspensión bacteriana obtenida se centrifugó durante 5 minutos a 12 000 xg a 4° C. El paquete bacteriano se lavó dos veces mediante la resuspensión en SSI estéril y centrifugación. La densidad óptica de la suspensión bacteriana en SSI se estimó a una longitud de onda de 690 nm, con el fin de ajustar la concentración requerida de unidades formadoras de colonias (UFC) en un volumen final de 100 µl, de acuerdo a los estándares de turbidez con sulfato de bario del nefelómetro de McFarland [197].

### **C. Preparación de proteínas de la superficie bacteriana**

Las proteínas solubles de superficie de S. typhimurium se prepararon de acuerdo con un método descrito previamente [198], con algunas modificaciones. El cultivo de S. typhimurium obtenido por incubación durante 12 horas a 37 °C en caldo cerebro-corazón (Difco) se centrifugó 5 min a 12000 xg a 4 °C. El paquete bacteriano se resuspendió en amortiguador de tricina (N-[Tris (hidroxi-metil) glicina]) (Sigma, St. Louis, MO), pH 7,2 y se centrifugó bajo las mismas condiciones. La pastilla bacteriana se mezcló con urea 6 M durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante, y finalmente se sonicó mediante la aplicación de

pulsos de 10-segundos a intervalos de 1 min cada uno, en un tiempo total de 3 minutos. El extracto bacteriano se centrifugó como se describió anteriormente, para obtener un sobrenadante enriquecido con proteínas solubles de superficie, el cual se dializó exhaustivamente contra agua destilada. El contenido de proteína del extracto se determinó con un kit de Bradford (Bio-Rad, México DF, México), antes de guardarlo por congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **D. Lactoferrina bovina**

Lactoferrina bovina (bLf) saturada al 3% con  $\text{Fe}^{3+}$  fue comprada a NutriScience (Trumbull, Connecticut, EE.UU.). La pureza de la bLf fue confirmada por electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) [199] y tinción del gel con azul de Coomassie brillante (Sigma) y tinción de plata.

#### **E. Diseño experimental**

Una dosis baja (5 mg/ratón) y una alta (100 mg/ratón) de bLf fueron elegidas para estudiar su efecto antibacteriano en ratones infectados con *S. typhimurium*. La dosis baja fue elegida en base a un estudio previo en ratones sanos, en el que se administraron 4 mg de bLf a cada ratón para evaluar las propiedades inmunogénicas de la bLf, utilizando las diferentes modalidades de administración por vía oral [13]. La dosis alta fue seleccionada a fin de ver un posible contraste de los efectos en relación a la dosis de 5 mg.

Dos grupos experimentales de 10 ratones fueron tratados durante 21 días por vía oral mediante el depósito bucal con una micropipeta con 5 ó 100 mg de bLf/ratón, disueltos en 100 ó 200  $\mu\text{l}$  de SSI estéril, respectivamente. El grupo control fue tratado por la misma ruta y durante el mismo tiempo con 200  $\mu\text{l}$  de SSI estéril. En el día 7 de post-tratamiento con bLf, estos tres grupos de ratones fueron infectados por intubación intragástrica con  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC, en 100  $\mu\text{l}$  de SSI estéril) de *S. typhimurium* y otros 3 grupos de 10 ratones (tratados y sin tratar con bLf) fueron infectados de la misma manera con  $10^4$  UFC/100 ml de

este patógeno. La mortalidad de cada grupo se registró diariamente durante 14 días post-infección.

Dado que  $10^4$  UFC resultó ser la dosis subletal de S. typhimurium que permitió la supervivencia de todos los ratones durante 14 días post-infección, fue elegida para evaluar los efectos de bLf sobre los parámetros relacionados con efecto antibacteriano y la producción de anticuerpos. En el día 7 de tratamiento con bLf o SSI, los tres grupos de ratones ( $n = 15$ ) se infectaron con  $10^4$  S. typhimurium (Figura 2). Tras la infección, la administración de bLf y de SSI estéril continuó mientras que la cosecha de heces se llevó a cabo todos los días hasta el sacrificio. Cinco ratones de cada grupo fueron anestesiados con éter para el sacrificio en los días 7, 14 ó 21 después de la infección, con el fin de recolectar muestras de suero, líquido intestinal, PP, el bazo y el tejido hepático. Como controles no infectados, tres grupos de ratones ( $n = 15$ ) fueron tratados por vía oral con bLf (5 ó 100 mg/ratón) o con solución salina estéril. El día 7, 14 ó 21 del tratamiento con bLf, correspondiente al día 0, 7 y 14 post-infección para los otros grupos (Figura 2), cinco ratones de estos grupos de control no infectados fueron sacrificados para recoger el suero y secreciones intestinales.

#### **F. Recolección de muestras**

Después de la infección, las heces recién eliminadas de cada ratón fueron recogidas y pesadas diariamente para estimar eliminación bacteriana basada en el método de recuento en placa descrito más adelante. Después del sacrificio, el hígado, el bazo y las PP de cada ratón infectado se extirparon y pesaron para enumerar la carga bacteriana por el método de recuento en placa. El contenido del intestino delgado se recolectó mediante el lavado con jeringa de 5 ml de solución salina estéril con fosfato (PBS) de pH 7.4; estas muestras de líquido intestinal fueron analizadas para estimar la eliminación bacteriana mediante el recuento en placa.

A partir de entonces, los líquidos intestinales se centrifugaron a 8000 xg por 15 min a 4 ° C y los sobrenadantes intestinales fueron recogidos y almacenados en congelación a -70 ° C con 100 µl de PHMB 150 mM por ml de muestra, hasta la evaluación de IgA total y específica (para las

proteínas de superficie de Salmonella y bLf) mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA). Las muestras de sangre recogidas por punción cardiaca se centrifugaron a 3000 xg por 10 min a 4 ° C para obtener el suero, que se almacenó a -70 ° C hasta la evaluación de anticuerpos IgG e IgM totales y específicos por ELISA. En los días 7, 14 y 21 post-tratamiento, cinco ratones del grupo control no infectado (sin tratar y tratados con bLf) se sacrificaron para recoger el suero y secreciones intestinales, y los niveles de anticuerpos totales y específicos fueron determinados por ELISA.

### **G. Enumeración bacteriana**

Las heces recién eliminadas de los ratones infectados fueron recogidas para determinar su peso húmedo. Estas muestras de materia fecal fueron suspendidas después en PBS estéril con Tritón al 0.05% (PBS-Triton) mediante agitación extensiva para preparar una suspensión fecal uniforme. Las muestras de PP, el hígado y el bazo se pesaron y se molieron sobre un tamiz de plástico hasta obtener una suspensión tisular uniforme. Muestras alícuotas de diluciones seriadas de los fluidos intestinales o fecales y suspensiones de tejidos preparados en PBS-Triton fueron cultivadas en agar Salmonella-Shigella (Difco) por incubación durante 48 horas a 37 ° C y se contó el número de colonias. La eliminación de bacterias en las heces y en las muestras de líquido intestinal se expresó como UFC/g y UFC/ml de la muestra, respectivamente. La colonización bacteriana en PP o la translocación bacteriana en el hígado y el bazo fueron expresados en UFC/g de tejido.

### **H. Ensayos inmunoenzimáticos de anticuerpos**

La determinación total de anticuerpos IgA en el líquido intestinal y de IgG e IgM en el suero de los grupos infectados o no, se llevó a cabo por el método estándar de ELISA con ciertas modificaciones [13]. Brevemente, placas de microtitulación de fondo plano de poli-estireno de 96 pozos (Nunc Maxi-SORP, Bioscience, San Diego, CA, EE.UU.) se recubrieron con 1 µg en 100 µl por pozo de suero de conejo anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM de ratón diluidos en amortiguador 0.1 M de carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Las placas se incubaron toda la noche

a 4 °C y se lavaron tres veces con Tween 20 al 0.05% disuelto en PBS (PBST) y 3 veces con PBS. Las placas fueron bloqueadas con la adición de 100 µl por pozo de leche descremada al 5% disuelta en PBS e incubación durante 2 horas a 37 °C, luego se lavaron 3 veces con PBST y 3 veces con PBS.

En los ratones infectados y no infectados, la determinación de IgG e IgM total se realizó con 100 µl de suero diluido en PBS 1:1000 y 1:4000, respectivamente, mientras que la IgA total se estimó con 100 µl de líquido intestinal diluido en PBS 1:2. Las muestras diluidas se añadieron a pozos recubiertos con el antígeno correspondiente, cada muestra diluida se evaluó por duplicado. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C y luego se lavaron 5 veces con PBST y 5 con PBS.

Un volumen de 100 µl de los siguientes anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante diluidos en PBS fue adicionado a cada pozo de las placas correspondientes: anti-IgG (Pierce, Rockford IL) o anti-IgA (Sigma) de ratón (diluidos 1:2000) y anti-IgM (Pierce) de ratón (diluido 1:5000). Las placas fueron luego incubadas durante 1 hora a 37 °C y se lavaron 3 veces con PBST y 3 veces con PBS. La reacción enzimática se desarrolló mediante la adición en cada pozo de 100 µl de sustrato (0,5 mg / ml de orto-fenilendiamina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.01% disueltos en amortiguador de citrato fosfato 0,05 M de pH 5,2). La reacción enzimática se detuvo con la adición a cada pozo de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M y la absorbancia (A<sub>λ</sub> de 490 nm) se midió en un lector de placas para el inmunoensayo enzimático (Sigma).

Para cuantificar anticuerpos totales, 100 µl por pozo de diluciones seriadas con concentración conocida de anticuerpos purificados IgG o IgM o cadenas k de mieloma IgA de ratón, se añadieron por duplicado a las placas de microtitulación previamente recubiertas con suero de conejo anti IgG, IgM o IgA de ratón, respectivamente.

Los pasos descritos anteriormente se aplicaron y los valores de absorbancia (eje Y) fueron graficados contra el correspondiente anticuerpo en µg/ml (eje X) para preparar curvas de



referencia y calcular la concentración de anticuerpos en  $\mu\text{g/ml}$ . En los ratones no infectados, los valores medios de anticuerpos totales en suero y líquido intestinal se compararon entre los tres grupos: los dos grupos tratados con bLf y el grupo control que no recibió tratamiento con bLf. En los ratones infectados, los valores medios de anticuerpos totales en suero y líquido intestinal también se compararon entre los tres grupos: los dos grupos tratados con bLf y el grupo que no recibió tratamiento con bLf. Por otra parte, los valores medios de anticuerpos totales de los ratones infectados tratados con bLf se compararon con el mismo parámetro con los de los ratones no infectados y no tratados con bLf.

La estimación de anticuerpos IgA, IgG o IgM dirigidos contra las proteínas de superficie de Salmonella [198] y contra bLf [13] se basó en métodos previamente descritos de ensayo inmuno-enzimático, con algunas modificaciones. Placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano se recubrieron por incubación durante la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con  $100\ \mu\text{l}$  por pozo de las siguientes soluciones de antígeno diluidas en amortiguador de bicarbonato-carbonato  $0,1\ \text{M}$  de pH 9,6:  $50\ \mu\text{g/ml}$  de proteínas de superficie de S. typhimurium o  $20\ \mu\text{g/ml}$  de bLf. Se llevaron a cabo 3 lavados con PBST y 3 con PBS antes y después de bloquear las placas recubiertas con las proteínas de superficie de Salmonella o bLf, con  $100\ \mu\text{l}$  por pozo de 5% de leche descremada o gelatina al 0,1% disuelta en PBS, respectivamente.

Las determinaciones de anticuerpos en ratones infectados se llevaron a cabo como sigue: En placas recubiertas con el antígeno de superficie de Salmonella, (i) los anticuerpos IgG o IgM vs proteínas de Salmonella fueron detectados por la adición  $100\ \mu\text{l}$  por pozo de suero diluido 1:1000 y 1:4000 en PBS, respectivamente y (ii) la IgA anti-Salmonella se detectó mediante la adición de  $100\ \mu\text{l}$  por pozo de las secreciones intestinales sin diluir. En las placas recubiertas con bLf, (i) la IgG e IgM vs bLf se evaluó mediante la adición de  $100\ \mu\text{l}$  por pozo de suero diluido 1:1000 en PBS (ii) y los anticuerpos IgA contra bLf fueron evaluados mediante la adición de  $100\ \mu\text{l}$  por pozo de las secreciones intestinales sin diluir. En las muestras de los ratones no

infectados la detección de anticuerpos se hizo como sigue. En placas recubiertas con Salmonella o bLf, (i) los anticuerpos IgG o IgM fueron evaluados mediante la adición de 100  $\mu$ l por pozo de suero diluido 1:1000 y (ii) los anticuerpos IgA se estimaron con la adición de 100  $\mu$ l por pozo de secreciones intestinales sin diluir. Los ensayos para cada dilución se llevaron a cabo por duplicado.

Después de agregar las muestras, las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Se aplicaron 5 lavados con 100  $\mu$ l por pozo de PBST y 5 con PBS para después adicionar 100  $\mu$ l por pozo de los siguientes anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante diluidos en PBS: anti-IgG (Pierce) o anti-IgA (Sigma) de ratón diluidos 1:2000 y anti-IgM (Pierce) de ratón diluido 1:5000.

Las placas se incubaron 1 hr a 37°C para aplicar después 3 lavados con PBST y 3 con PBS. Tras lavar, un volumen de 100  $\mu$ l de la solución de sustrato fue adicionado a cada pozo. La reacción enzimática se detuvo con 50  $\mu$ l de 2,5 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la absorbancia a  $\lambda$  de 490 nm se midió en un lector de placas para el enzimático inmunoensayo (Sigma).

Los niveles de anticuerpos contra las proteínas de la superficie de Salmonella y contra bLf en suero y secreciones intestinales se expresaron con el valor correspondiente a la media de absorbancia (A<sub>490nm</sub>). Los valores medios de A<sub>490nm</sub> de ratones no infectados tratados con bLf se compararon con el grupo control no infectado que no fue tratado con bLf. Por otra parte, los valores medios de A<sub>490nm</sub> de los ratones infectados tratados con bLf se compararon con los grupos control no infectados e infectados de ratones no tratados con bLf.

## **I. Estadística**

Los resultados se informaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD) a menos que se haya indicado lo contrario. Las comparaciones del valor de la media se hicieron mediante el ANOVA de una vía. Cuando ANOVA fue significativo, las pruebas post-hoc Tukey o Dunn se aplicaron para estimar las diferencias significativas entre grupos. Las diferencias se consideraron

significativas a  $P < 0,05$ . Los cálculos estadísticos se realizaron con la versión 2 de software Sigma Stat.

## V. RESULTADOS

### 1. Curvas de Supervivencia

Se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre los grupos de ratones tratados con bLf o el vehículo y posteriormente infectados por vía intragástrica con una dosis letal ( $10^8$  UFC) de S. typhimurium (Figura 2). La supervivencia después de la infección en los ratones del grupo control fue de 80% en el día 2, 60% en los días 4-6, el 50% en el día 7 y el 40% en los días 8-14. Por el contrario, la supervivencia de ratones en los dos grupos tratados con 5 ó 100 mg de bLf fue significativamente superior al testigo. Ambos grupos experimentales mostraron el mismo porcentaje de supervivencia; 100% hasta el día 8 post-infección, y el 80% a partir del día 9 a 14 post-infección. Por lo tanto, el tratamiento con bLf tuvo un efecto positivo para aumentar la supervivencia de los ratones infectados.

Todos los ratones que sobrevivieron a los 14 días post-infección con la dosis letal, tanto del grupo control como los tratados con bLf, mostraron erizamiento de pelo, debilidad y somnolencia. La hipotermia fue detectada por contacto manual en ratones moribundos. Por otra parte, en los ratones que recibieron una dosis subletal ( $10^4$  UFC) de S. typhimurium, el porcentaje de supervivencia fue del 100% durante los 14 días post-infección, tanto en el control como en los ratones tratados con bLf (datos no mostrados); todos estos ratones parecían estar vivaces, activos y normales; estos ratones no mostraron los síntomas de los infectados con la dosis letal. En consecuencia,  $10^4$  UFC de S. typhimurium fue elegida como la dosis para probar el efecto de la bLf sobre la carga bacteriana intestinal y la sistémica, así como su relación con la respuesta de anticuerpos a nivel intestinal y sistémica contra la infección por S. typhimurium.

### 2. Carga bacteriana intestinal

Como consecuencia de la administración de las bacterias mediante intubación intragástrica, ocurrió la concomitante colonización bacteriana intestinal. Por lo tanto, el curso de la

eliminación de bacterias en las heces de ratones infectados con  $10^4$  UFC de S. typhimurium (tratados o no con Lf) fue evaluado hasta el sacrificio. No hubo diferencias significativas en la carga bacteriana de las heces de los animales tratados con 5 ó 100 mg de bLf. Del día 1 al 14 post-infección (Figura 3A), la eliminación bacteriana en las heces de los ratones tratados con bLf fue significativamente menor ( $P < 0,01$ ) que la de los no tratados. Sin embargo, en los ratones tratados con bLf las bacterias no se eliminaron por completo, lo que indica que estos ratones estuvieron infectados durante este periodo de tiempo.

Del día 14 al 15 post-infección, se observó una reducción (de aproximadamente 100 a 1000 veces) en la eliminación de bacterias fecales en todos los grupos. Este descenso continuó 21 días después de la infección en los animales que fueron tratados o no con bLf (Figura 3B). En el día 15 post-infección, ambos grupos de ratones tratados con bLf mostraron una menor carga bacteriana en las heces ( $P < 0,05$ ) que el grupo control, pero no hubo diferencias significativas entre estos dos grupos. En los días 16, 17 y 19 post-infección, la carga bacteriana de las heces fue menor en los ratones tratados con 100 mg que con 5 mg de bLf ( $P < 0,05$ ). Sólo los ratones tratados con 100 mg de bLf mostraron una eliminación bacteriana significativamente menor ( $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo control. En los días 18, 20 y 21 post-infección, no hubo diferencia significativa en la eliminación fecal bacteriana entre cualquiera de los tres grupos infectados, tratados o no tratados con bLf (Figura 3B). Recapitulando los resultados, los grupos tratados con bLf mostraron niveles significativamente más bajos de bacterias en las heces hasta el 15 día post-infección, sin diferencia entre los dos grupos tratados. Del día 15 a 21 se observó una reducción en la eliminación fecal de bacterias de los tres grupos infectados. En los días 16, 17 y 19, la única diferencia significativa fue la eliminación bacteriana más baja en los animales tratados con 100 mg de bLf, en comparación con los otros dos grupos. Por último, la eliminación de bacterias en los días 18, 20 y 21 siguió disminuyendo sin ninguna diferencia significativa entre los tres grupos infectados, lo que significa que en este punto la reducción del número de bacterias eliminadas parece no haber estado relacionada con la administración bLf.

A fin de ampliar la evaluación a nivel local del efecto antibacteriano de las dos dosis de bLf, la carga bacteriana se determinó también en las secreciones intestinales. La carga bacteriana fue significativamente menor en los días 7 y 14 post-infección ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados con cualquiera de las dosis de bLf, en comparación con los animales no tratados con esta glicoproteína (Figura 4A). La carga bacteriana en las secreciones intestinales del grupo no tratado con bLf alcanzó su punto máximo en el día 14 post-infección. En el día 7 post-infección la carga bacteriana en las secreciones intestinales fue similar en ambos grupos tratados con bLf, sin embargo, en el día 14 fue significativamente menor en los ratones tratados con 100 mg que con 5 mg de bLf ( $P < 0,05$ ). En el día 21 post-infección, la única diferencia significativa en la carga bacteriana de las secreciones intestinales fue en el grupo tratado con 100 mg de bLf que tuvo un valor significativamente menor ( $P < 0,05$ ), que los otros dos grupos infectados (Figura 4A). En las secreciones intestinales, como en las heces, en los días 7 y 14 post-infección ambas dosis de bLf parecen haber contribuido a la disminución de la cuenta bacteriana, en comparación con el grupo no tratado con bLf. Sin embargo, a diferencia de lo observado en las heces, en las secreciones intestinales: (i) en el día 14 hubo un recuento bacteriano significativamente menor en el grupo tratado con 100 mg que con de 5 mg de bLf, y (ii) en el día 21 el recuento bacteriano fue significativamente menor en el grupo tratado con 100 mg de bLf que en los otros dos grupos infectados.

La carga bacteriana intestinal de los ratones infectados también se exploró mediante el análisis de la colonización bacteriana en PP, ya que representan las principales puertas de entrada del patógeno hacia el compartimento sistémico (Figura 4B). Así, esta evaluación puede ser útil para comparar el efecto de bLf sobre la disminución bacteriana observada en las secreciones intestinales y para la consecución de más información sobre el efecto antibacteriano local de ambas dosis bLf.

La mayor colonización bacteriana en PP se detectó en el grupo no tratado con bLf, que alcanzó su punto máximo en el día 14 post-infección (Figura 4B). En comparación con el grupo

control, la colonización bacteriana en PP en el día 7 y 14 post-infección fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados tanto con 5 como con 100 mg de bLf, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre estos dos grupos tratados con bLf. Al igual que lo observado en heces (Figura 3) la carga bacteriana disminuyó en todos los grupos en el día 21 post-infección (Figura 4B). En este último día, la única diferencia significativa encontrada fue la menor carga bacteriana intestinal en PP ( $P < 0,05$ ) en el grupo tratado con 100 mg de bLf, en comparación con los otros dos grupos (Figura 4B, inserto). Estos resultados, al igual que con las secreciones intestinales, sugieren que en PP (i) sólo en los días 7 y 14 post-infección ambas dosis de bLf parecen haber sido efectivas para disminuir la colonización bacteriana, y (ii) en el día 21 post-infección, sólo el grupo de ratones tratado con la dosis de 100 mg de bLf mostró una colonización bacteriana significativamente más baja entre los tres grupos de ratones infectados.

### **3. Carga bacteriana sistémica**

Para evaluar el efecto de la bLf sobre la capacidad de S. typhimurium de invadir el epitelio intestinal y propagarse a través de la circulación sanguínea hacia sus principales órganos blanco sistémicos, la translocación bacteriana se evaluó en el hígado y el bazo de los tres grupos de ratones infectados. El nivel más alto de la carga bacteriana en el hígado y el bazo se observó en los ratones del grupo control en el 14 día post-infección (Figura 5A y 5B). En el día 7 y 14 post-infección, la carga bacteriana en el hígado y el bazo fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados tanto con 5 como con 100 mg de bLf, en comparación con el grupo control, tiempo durante el cual no se observaron diferencias significativas entre estos dos grupos tratados con bLf. En el día 21 post-infección, el recuento de bacterias fue significativamente menor en los tres grupos en comparación con los valores respectivos en los días 7 y 14. En el día 21 post-infección, no hubo diferencias significativas entre cada uno de estos grupos con respecto a este parámetro, aunque hubo una tendencia a un nivel más alto en el bazo en los ratones tratados con 100 mg de bLf (Figura 5B). Ambas dosis de bLf fueron

efectivas sobre la reducción de la carga bacteriana en el hígado y en el bazo en los días de 7 a 14 post-infección. Esta valoración no se pudo determinar en el día 21 debido a que el grupo control de ratones infectados eliminaron la bacteria en forma natural.

#### **4. Respuesta total de anticuerpos IgA, IgG e IgM**

Para ver si los efectos antibacterianos de la bLf, evaluados en compartimentos locales y sistémicos, estaban relacionados con la respuesta de anticuerpos, primeramente el total de IgG e IgM en el suero e IgA en las secreciones intestinales se evaluó en los tres grupos de ratones no infectados (control y dos grupos tratados bLf). En los días 7, 14 y 21, los niveles totales de anticuerpos IgA (Figura 6A, arriba a la izquierda), IgG (Figura 6C, central izquierdo) e IgM (Figura 6E, abajo a la izquierda) en ambos grupos tratados con bLf resultaron ser significativamente ( $P < 0,05$ ) más altos que los del grupo control.

En el día 7, se observaron niveles significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) del total de anticuerpos IgA (Figura 6A) e IgG (Figura 6C) en los ratones tratados con 100 mg que con 5 mg de bLf. En contraste, en ese mismo día, la IgM total fue mayor ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados con 5 mg que con 100 mg de bLf (Figura 6E). En el día 14, no se observaron diferencias significativas en el total de IgA, IgG e IgM entre ambos grupos de ratones tratados con bLf. Para el día 21, no se encontraron diferencias en los niveles totales de IgA e IgG entre los dos grupos tratados bLf, pero hubo un mayor nivel de IgM total ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados con 100 mg que con 5 mg de bLf (Figura 6E). Independientemente de las diferencias mostradas entre los ratones tratados con 5 o 100 mg de bLf, en términos generales, estos resultados sugieren que ambas dosis de bLF mostraron propiedades inmunogénicas al estimular el aumento del total de IgA, IgG e IgM en los ratones sanos en todos los días evaluados.

Los niveles totales de anticuerpos IgG e IgM en suero e IgA en las secreciones intestinales también fueron evaluados en los tres grupos de ratones infectados. En los días 7, 14 y 21 post-infección, los niveles totales de anticuerpos IgA (Figura 6B, arriba a la derecha) e IgG (Figura

6D, central derecho) en los dos grupos de ratones tratados con bLf mostraron un aumento significativo ( $P < 0,05$ ), en comparación con el grupo de ratones infectados no tratados con bLf, así como en comparación con el grupo de ratones no infectados y no tratados con bLf. No hubo diferencias significativas en los niveles de anticuerpos IgA entre los grupos tratados con 5 ó 100 mg de bLf en cualquiera de los tres días evaluados (Figura 6B). Por el contrario, un nivel significativamente mayor de IgG total fue encontrado el día 14 post-infección ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados con 5 mg que con 100 mg de bLf, mientras que en los días 7 y 21 post-infección no se encontraron diferencias significativas en este sentido (Figura 6D).

En los días 7 y 14 post-infección, los niveles de IgM total fueron mayores ( $P < 0,05$ ) en los dos grupos tratados con bLf que en los dos grupos no tratados con bLf (no infectados e infectados) (Figura 6F fondo a la derecha). En estos dos días, no hubo diferencia significativa entre los dos grupos tratados con bLf respecto a este parámetro (Figura 6F). En el día 21, no hubo diferencias significativas en el nivel de IgM total entre cualquiera de los tres grupos infectados. Sin embargo, hubo un nivel significativamente más alto de este anticuerpo en los tres grupos infectados que en el grupo control no infectado. En términos generales, se puede decir que en los ratones infectados, la totalidad de la producción de IgA y anticuerpos IgG fue promovida por bLf en todos los días de prueba, mientras que un aumento significativo de IgM total se observó sólo en relación con ambas dosis de bLf en los días 7 y 14 post-infección. En el día 21 post-infección, ninguna dosis de bLf mejoró la producción total de IgM.

## **5. Anticuerpos IgA, IgG e IgM contra proteínas de superficie de Salmonella**

Para explorar una posible relación entre los efectos antibacterianos de la bLf (evaluada en los compartimentos local y sistémico) y la respuesta inmune contra S. typhimurium, los anticuerpos IgG e IgM en suero e IgA en las secreciones intestinales contra proteínas de la superficie de Salmonella se evaluaron en los tres grupos de ratones no infectados (control y dos grupos tratados con bLf) y en los ratones infectados con o sin tratamiento con bLf. Una simple observación visual de la Figura 7 evidencia el hecho de que en todos los días de evaluación de



los niveles de anticuerpos IgA (Figura 7B arriba a la derecha), IgG (Figura 7D centro a la derecha) e IgM (Figura 7F abajo a la derecha), contra las proteínas de superficie de Salmonella, fueron mayores en los ratones infectados (sean o no tratados con bLf) que en los ratones no infectados. Sin embargo, el tratamiento con bLf en los ratones no infectados estimuló el aumento de anticuerpos IgM en los días 7 y 14 siendo este aumento mayor en grupo tratado con 5 mg de bLf ( $P < 0,05$ ) en comparación al grupo tratado con 100 mg de bLf o el grupo no tratado con esta glicoproteína (Figura 7E, abajo a la izquierda). Entre los dos últimos grupos, no hubo diferencias significativas en relación a este parámetro. En el día 21, los niveles de IgM contra las proteínas de superficie de Salmonella en los dos grupos no infectados tratados con bLf fueron mayores ( $P < 0,05$ ) que los del grupo de control. No se encontraron diferencias significativas entre estos dos grupos tratados con bLf con respecto a este parámetro (Figura 7E).

Mientras que en los ratones no infectados no hubo un efecto aparente de la bLf sobre el aumento de anticuerpos IgA e IgG frente a proteínas de superficie de Salmonella, parece que ambas dosis de bLf aumentaron la producción de anticuerpos IgM de reacción cruzada contra las proteínas de superficie bacteriana en todos los días evaluados. Sin embargo, los resultados fueron bastante diferentes en los grupos de ratones infectados. Todos los anticuerpos estimados contra las proteínas de superficie de Salmonella mostraron un incremento en los grupos infectados tratados con bLf

En los días 7, 14 y 21 post-infección, hubo mayores niveles de anticuerpos IgA específicos ( $P < 0,05$ ) en ambos grupos tratados con bLf que en los dos grupos no tratados con esta glicoproteína (infectados o no infectados, Figura 7B arriba a la derecha). La única diferencia significativa de IgA específica entre los dos grupos tratados con bLf ( $P < 0,05$ ) fue encontrada en el día 21 post-infección, día en el cual fue más alta en los ratones tratados con 100 mg que con 5 mg de bLf. En el día 7 post-infección, hubo un mayor nivel de IgG específica ( $P < 0,05$ ) en el grupo tratado con 100 mg de bLf que en los otros dos grupos infectados (tratados con 5 mg de

bLf y no tratado) y los ratones no infectados (no tratados). En los días 14 y 21 post-infección, ambos grupos de ratones tratados con bLf mostraron mayores niveles de anticuerpos IgG específicos ( $P < 0,05$ ) que los dos grupos de control (infectados y no infectados). En estos mismos días, no se encontraron diferencias significativas en este parámetro entre los dos grupos tratados con bLf (Figura 7D, centro a la derecha).

En el día 7 post-infección, los niveles de anticuerpos IgM específicos en ambos grupos de ratones tratados con bLf fueron mayores ( $P < 0,05$ ) que en los dos grupos control (infectados y no infectados), y fueron superiores ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados con 5 mg que con 100 mg de bLf. En el día 14 y 21 post-infección, no hubo diferencias significativas de anticuerpos IgM específicos entre cualquiera de los tres grupos infectados. Sin embargo, hubo una diferencia significativa entre estos tres grupos infectados en comparación con el grupo de no infectados no tratados con bLf (Figura 7, abajo a la derecha). Estos hallazgos muestran que en ratones infectados: (i) la producción de anticuerpos IgA contra las proteínas de superficie de Salmonella fue promovida por ambas dosis de bLf en todos los días de la prueba; (ii) la IgG contra las proteínas de la superficie de Salmonella fue promovida por 100 mg de bLf en los días 7, 14 y 21 post-infección y con 5 mg de bLf en los días 14 y 21 post-infección, y (iii) la producción de IgM contra las proteínas de superficie de Salmonella fue reforzada por las dos dosis de bLf sólo el día 7 post-infección.

## **5. Anticuerpos IgA, IgG e IgM contra bLf**

A fin de ver una relación de los efectos antibacterianos de la bLf, evaluado en compartimentos local y sistémico con la respuesta inmune hacia la bLf, los anticuerpos IgG e IgM en suero e IgA en las secreciones intestinales contra la bLf se evaluaron en los tres grupos de ratones no infectados (los dos grupos tratados con bLf y el grupo no tratado con esta glucoproteína). La respuesta de anticuerpos contra la bLf inducida por las dos dosis probadas fue evaluada en suero o secreciones intestinales de los ratones no infectados e infectados.

En los ratones no infectados, los niveles de IgA, IgG e IgM anti-bLf fueron mayores en los ratones tratados con esta glicoproteína ( $P < 0,05$ ) que en los ratones no tratados en todos los días de medición (Figura 8A, C y E). En los días 7, 14 y 21 post-tratamiento, los niveles de IgA contra bLf fueron mayores ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados con 100 mg que en los tratados con 5 mg de bLf (Figura 8A, arriba a la izquierda). En el día 14 post-tratamiento con bLf, un nivel significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) de anticuerpos IgG contra bLf se observó en los ratones tratados con 100 mg que con 5 mg de bLf. En los días 7 y 21 post-tratamiento, no hubo diferencia significativa en el aumento de la IgG vs bLf en los ratones tratados con 5 ó 100 mg de esta glicoproteína (Figura 8B, centro a la izquierda). No se encontraron diferencias en relación con el aumento de la IgM anti-bLf entre los grupos tratados con 5 ó 100 mg de bLf en cualquier día de la prueba (Figura 8E, abajo a la izquierda). Con base en estos resultados, parece que ambas dosis de bLf mejoraron un aumento de IgA, IgG e IgM contra la bLf en ratones sanos en los días 7, 14 y 21 de tratamiento.

La evaluación de la respuesta de anticuerpos vs bLf en ratones infectados mostró que en todos los días de prueba el aumento de IgA e IgG contra bLf en ratones tratados con 5 ó 100 mg de bLf fue mayor ( $P < 0,05$ ) que en los grupos no infectados e infectados no tratados con bLf (Figura 8B y D). Sin embargo, una diferencia significativa en el aumento ( $P < 0,05$ ) de IgM con 5 y 100 mg de bLf en comparación con los ratones infectados y no infectados no tratados con bLf sólo se observó en los días 7 y 14 post-infección. En el día 21, no hubo una diferencia significativa en el aumento de IgM en los ratones infectados tratados o no tratados con bLf, pero sí hubo una diferencia significativa en el incremento entre los animales infectados (tratados o no con bLf) y los ratones no infectados y no tratados con bLf.

En los días 7 y 14 post-infección, la IgA vs bLf fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en los ratones infectados tratados con 100 mg que con 5 mg de esta glicoproteína. En el día 21 no se encontraron diferencias significativas con respecto a este parámetro entre los dos grupos tratados con bLf (Figura 8B, arriba a la derecha).

Con respecto a la IgG vs bLf, mientras que en el día 14 post-infección un mayor incremento ( $P < 0,05$ ) en este parámetro se observó en los ratones infectados tratados con 100 mg que con 5 mg de bLf (Figura 8D, centro derecha), no hubo diferencia entre los dos grupos tratados con bLf en los días 7 y 21 post-infección. En cuanto a IgM vs bLf, no hubo diferencia en el aumento de IgM en dos grupos tratados bLf-en cualquier día de la medición en los animales infectados (Figura 8, abajo a la derecha). En resumen, estos resultados muestran que en ratones infectados, ambas dosis de bLf estimularon un mayor aumento de IgA e IgG vs bLf en comparación con los animales no tratados con esta glicoproteína en todos los días de prueba, y el aumento de IgM anti-bLf sólo en los días 7 y 14 post-infección. Un mayor nivel de anticuerpos contra bLf fue encontrado en los ratones tratados con 100 mg en comparación con los tratados con 5 mg en los días 7 y 14 para IgA y el día 14 para IgG. No hubo tal diferencia en ningún día medido en relación a la IgM.

## VI DISCUSIÓN

Ensayos anteriores basados en modelos animales de infección experimental demostraron la acción protectora de Lf al reducir la mortalidad causada por bacterias patógenas [91, 92]. En el presente estudio la administración de bLf por depósito bucal redujo también la mortalidad entre ratones naturalmente susceptibles Balb /C infectados mortalmente por la vía intragástrica con  $10^8$  UFC de S. typhimurium [Figura 2]. La eficiente protección contra la mortalidad obtenida con esta glicoproteína fue demostrada a una dosis de S. typhimurium 1000 veces mayor que la DL50 correspondiente a  $10^5$  UFC evaluada en otro estudio en ratones Balb /C infectados intragástricamente con la cepa S. typhimurium 14028 [200].

Otros estudios en modelos animales de infección con dosis subletales también han demostrado que Lf administrada por vía oral a ratones disminuye la carga bacteriana en el intestino [88], estómago [89], hígado [90] y vejiga urinaria [96]. En la presente contribución, en ratones que recibieron una dosis intragástrica subletal de S. typhimurium ( $10^4$  UFC), el tratamiento con bLf dio lugar a una disminución de la carga bacteriana en el intestino [Figura

4B], el bazo y el hígado [Figura 5], una reducción de la eliminación bacteriana intestinal [Figuras 3 y 4A], y a un aumento de los anticuerpos totales [6] y específicos contra los antígenos de superficie de Salmonella y contra bLf [Figuras 7, 8]. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio *in vivo* que muestra una relación entre la disminución de la carga bacteriana y el aumento de la respuesta de anticuerpos inducida por la lactoferrina.

Los mecanismos subyacentes de las propiedades antibacterianas de Lf en relación con la infección por S. typhimurium pueden incluir la desestabilización de la membrana celular externa [16, 21], disminución de la adherencia intestinal [24], y / o la estimulación de muerte bacteriana por fagocitosis a través de un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [25]. Tras la administración oral de bLf descrita en el estudio actual, los efectos antibacterianos en relación a S. typhimurium en los dos blancos sistémicos principales de este patógeno en los ratones (el hígado y el bazo) [117] pueden ser debidos al hecho de que la bLf se absorbe en una forma no digerida en el intestino y se mantiene sin digerir durante su tránsito hacia la circulación sanguínea hasta distribuirse a estos dos órganos [62]. A pesar de resistir proteólisis una porción de la bLf se pudo haber degradado en estómago para generar lactoferrinas con actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, aunque los mecanismos directos antibacterianos mediados por bLf pueden estar participando en la disminución de los niveles bacterianos en los tejidos, los implicados son probablemente algunos efectos secundarios de la influencia inmunomoduladora de esta glicoproteína sobre los componentes humorales y celulares de las PP y el bazo [11]. Es decir, la producción de anticuerpos contra las proteínas de la superficie de Salmonella fue modulada diferencialmente por bLf en ratones no infectados en comparación con infectados. Mientras que un aumento en la respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM contra las proteínas de superficie de Salmonella en los ratones infectados fue inducida por el tratamiento con la bLf; en ratones no infectados, esta glicoproteína sólo produjo un incremento de anticuerpos IgM de reacción cruzada contra las proteínas de superficie de Salmonella

[Figura 7]. En contraste con la respuesta de anticuerpos contra las proteínas de superficie de Salmonella, en ratones no infectados e infectados se observó un aumento en los niveles de anticuerpos IgA, IgG e IgM totales y contra la bLf [Figuras 6 y 8]. Además de confirmar los reportes anteriores sobre el efecto inmunomodulador de la bLf sobre la producción de anticuerpos totales y anti-bLf en ratones no infectados [12, 13], nuestro trabajo demuestra el mismo efecto inmunomodulador dosis-independiente de la bLf en ratones infectados.

La influencia dosis-independiente de bLf cuando se administra en forma continua por vía oral ,podría estar relacionada con la regulación de la absorción intestinal de esta glicoproteína, y también a su eliminación de la luz intestinal Al parecer, sólo una fracción inmunogénica de la dosis total de bLf administrada por el depósito bucal en los ratones infectados estimuló la producción intestinal y sistémica de anticuerpos por la activación de las células inmunocompetentes de las PP y el bazo. El resto de la bLf administrado por vía oral podría haber formado complejos inmunes con anticuerpos, principalmente inmunoglobulina A secretora (sIgA), expulsados de la luz intestinal por exclusión inmunitaria. Además, los complejos inmunitarios bLf-sIgA podrían haber reducido la absorción intestinal de la bLf, disminuyendo reacciones potencialmente dañinas de hipersensibilidad generadas por la administración oral constante de bLf, como se ha sido previamente sugerido [62]. Debido al hecho de que en términos generales no se observaron efectos diferenciales sobre la carga bacteriana con la dosis de 5 y 100 mg de bLf administradas por vía oral, queda por explorar la dosis mínima de bLf que exhiba efectos antibacterianos.

En el presente estudio, observamos que la bLf incrementó la respuesta de anticuerpos IgA, IgG y IgM total, así como la específica contra las proteínas de superficie de Salmonella generados por la infección por S. typhimurium. Estudios previos han informado que en las primeras etapas de la infección primaria con S. typhimurium, se generan anticuerpos de baja afinidad [155, 193], específicos contra proteínas de superficie de Salmonella [193] y anticuerpos de reacción cruzada contra antígenos de Salmonella [201]. A medida que la infección progresa,

aumentan los niveles de anticuerpos específicos de alta afinidad [193]. El papel de los anticuerpos generados en la respuesta primaria a la infección por S. typhimurium se ha explorado en modelos experimentales de infección en ratones deficientes (knock-out) del receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR<sup>-/-</sup>) [155], así como en ratones deficientes en células B (Igμ<sup>-/-</sup>) [189] y CD154 [193]. Durante la respuesta primaria, los anticuerpos intestinales no específicos IgA bloquean la invasión de S. typhimurium en el epitelio intestinal [155]. Experimentos de infección intraperitoneal con S. typhimurium opsonizada con anticuerpos IgG e IgM muestran que los anticuerpos sistémicos específicos de baja afinidad reducen la colonización bacteriana del bazo y la bacteremia [193]. En concordancia con lo anterior, los resultados del presente ensayo sugieren que la bLf estimuló un aumento total y específico de anticuerpos de baja afinidad que contribuyó a una disminución bacteriana en el intestino y a nivel sistémico. Ensayos experimentales de la transferencia pasiva de anticuerpos de ratones donadores infectados tratados con bLf a ratones receptores retados con S. typhimurium podría responder sobre el posible papel de los anticuerpos inducidos por la bLf sobre la protección a la infección causada por este patógeno.

Los grupos control (no infectados o infectados) fueron tratados con solución salina estéril o PBS como se ha hecho en otros estudios para evaluar el efecto antibacteriano de lactoferrina en modelos animales de infección experimental [27, 90, 92,96]. No se administraron por vía oral proteínas de la leche a los grupos que se utilizaron como control, ya que pueden actuar como nutrientes que mejoran el crecimiento de bacterias intestinales, como lo demostró un estudio en el que las proteínas de la leche administradas por vía oral en ratones aumentaron la sobreproliferación bacteriana en el intestino, lo que a su vez promovió la propagación de las bacterias intestinales a órganos sistémicos. En el estudio citado, esta translocación bacteriana inducida por proteínas de la leche fue inhibida por la bLf administrada por vía oral [202].

El presente estudio sugiere que el efecto de la bLf sobre la disminución temprana de la carga bacteriana en los sitios intestinales y sistémicos está probablemente relacionado con su

capacidad de estimular rápida y continuamente la producción total y específica de anticuerpos sólo durante los primeros 15 días post-infección. Por el contrario, de los días 16 al 21 post-infección, la carga bacteriana disminuyó [Figuras 3, 4, 5] independientemente de la respuesta de anticuerpos totales y específicos inducidos por el tratamiento con bLf [Figuras 6, 7, 8]. Teniendo en cuenta la influencia de la bLf sobre la generación de anticuerpos y citocinas en las PP y bazo [13], parece que durante los primeros días de la infección los componentes humorales y celulares de la respuesta inmune se activaron como consecuencia de la administración de bLf y dichos componentes contribuyeron al proceso natural de eliminación bacteriana. Es importante destacar que no se puede hacer una relación de causalidad directa entre el aumento de anticuerpos y una disminución de la carga bacteriana, no sólo porque se carece de los estudios experimentales, sino también por el hecho de que la protección contra S. typhimurium es un evento multifactorial basado en mecanismos complejos en los que participan componentes humorales y celulares del sistema inmune, tanto innato como adaptativo [158].

Se ha demostrado que los anticuerpos intervienen en el control de la infección por Salmonella en la fase extracelular del patógeno por varios mecanismos, incluyendo los anticuerpos protectores de la mucosa implicados en la exclusión inmunitaria [153], al bloquear la adherencia intestinal y / o la penetración del patógeno a través de la barrera de la mucosa, y los anticuerpos sistémicos como efectores opsonizantes que mejoran la actividad bactericida de células fagocíticas al dirigir las bacterias infectantes hacia una muerte lisosomal [195]. El papel de los anticuerpos específicos contra bLf en la resistencia a la infección por Salmonella no está completamente claro pero su potencial de reacción cruzada puede permitir su unión a la S.typhimurium, para así favorecer su opsonización y / o contribuir a la exclusión inmune con el fin de eliminar a la bacteria de la luz intestinal. Los anticuerpos anti-bLf pueden pertenecer al conjunto de IgA (e IgM) con un papel esencial en la protección de la mucosa frente a patógenos asociado a la poli-reactividad mediada por Fab y / o interacciones glicano [203].



Otros componentes podrían también ser activados por la administración oral de bLf, tales como la promoción de la actividad mortífera de las células fagocíticas, que tienen un papel esencial en el control de la infección intracelular de S. typhimurium [191] y en la inflamación. Otro estudio reciente apoya el papel protector de la bLf contra la infección por Salmonella asociado con la gravedad y el grado de inflamación en los ratones infectados con S. typhimurium [27]. La contribución actual sienta las bases para futuros estudios que podrían proporcionar pruebas más concretas acerca de la importancia de los anticuerpos frente a otros factores en la disminución de la carga bacteriana tras el tratamiento con Lf, así como los mecanismos involucrados con cada uno de estos factores, incluyendo posibles efectos terapéuticos o profilácticos del tratamiento con Lf.

En conclusión, la menor mortalidad y la disminución de los niveles de bacterias que acompañó a la administración de la bLf en ratones infectados podrían haber sido causadas por su actividad antibacteriana y / o por su efecto inmuno-modulador sobre las células inmuno-competentes del PP y el bazo, el último de los cuales está involucrado en la producción local y sistémica de anticuerpos generados en el transcurso de la invasión de S. typhimurium. Los efectos sustantivos de la bLf sobre la respuesta inmune humoral intestinal y sistémica del organismo para controlar la infección por S. typhimurium, deben explorarse para evaluar la posibilidad de emplear esta proteína como un agente terapéutico o inmunomodulador en las infecciones causadas por cepas de S. typhimurium que son multi-resistentes a los antibióticos. Adicionalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden ser un referente a otros estudios sobre la infección sistémica causada por S. typhi en humanos.

## VII. CONCLUSIONES

Se puede afirmar los objetivos específicos relativos a evaluar en ratones infectados por vía intragástrica con S. typhimurium se alcanzaron debido a que:

1. La bLf redujo significativamente la eliminación bacteriana intestinal de S. typhimurium en heces y líquido intestinal
2. La bLf redujo significativamente la colonización bacteriana de S. typhimurium en placas de Peyer, hígado y bazo
3. La bLf incrementó significativamente la producción total de IgG e IgM en suero e IgA en líquido intestinal
4. La bLf incrementó significativamente la producción de IgG e IgM en suero y de IgA en líquido intestinal, contra las proteínas de superficie de S. typhimurium y contra bLf.

Se pudo ver que sólo en los primeros 15 días post-infección hubo una relación entre la reducción de la cuenta bacteriana de S. typhimurium a nivel intestinal y sistémico y el aumento de anticuerpos. Posteriormente hubo una reducción de la carga bacteriana que no tuvo relación con el aumento sostenido de anticuerpos debido al proceso natural de eliminación bacteriana del hospedero murino.

## VIII. PERSPECTIVAS

Algunos aspectos importantes de evaluar de acuerdo a los resultados son:

- Estimar la dosis antibacteriana mínima de bLf capaz de estimular la producción de anticuerpos asociada con la reducción de la carga bacteriana en ratones tratados con diferentes dosis de bLf e infectados con S. typhimurium.
- Realizar experimentos de transferencia pasiva de suero obtenido de ratones donadores tratados con bLf e infectados con S. typhimurium a ratones receptores retados con S. typhimurium para explorar in vivo el efecto sustantivo de los anticuerpos en la resistencia hacia la infección causada por este patógeno.

- Alternativamente, explorar el efecto protector de los anticuerpos en ratones infectados oralmente con S. typhimurium opsonizada con anticuerpos (presentes en suero o en líquido intestinal) provenientes de ratones donadores tratados con bLf e infectados con S. typhimurium
- Estimar los efectos profiláctico y terapéutico de la bLf antes o después, respectivamente, de infectar a los ratones Balb/c por vía intragástrica con S. typhimurium
- Otros ensayos que podrían explorar el efecto de la bLf sobre la relación entre la reducción de la carga bacteriana y el incremento de anticuerpos obtenida en este estudio podría ser evaluar la generación de células formadoras de anticuerpos e interleucinas por ELISPOT, citometría de flujo y RT-PCR
- Este tipo de estudio podría ser útil para estimar los efectos principales de la bLf como agente antibacteriano e inmunomodulador en infecciones causadas por cepas de S. typhimurium multi-resistentes a antibióticos.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sørensen M, Sørensen SPL. The proteins in whey. C.R. Trav. Lab. Carlsberg 1939; 23:55-99.
- [2] Johansson B. Isolation of an iron containing red protein from human milk. Acta Chem Scand 1960; 14:510-2.
- [3] Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. Biochimie 2009; 91:52-7.
- [4] Weinberg ED. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. J Pharm Pharmacol 2001; 53:1303-10.
- [5] Drago Serrano ME. Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. Rev Mex Cienc Farm 2007; 38:30-8.
- [6] Baker EN, Baker HM. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. Biochimie 2009; 91:3-10.
- [7] Russell MW, Bobek LA, Brock JH, Hajishengallis G, Tenovuo J. Innate humoral defense factors. In: Mestecky J, Bienenstock J, Lamm ME, Mayer L, McGhee JR, Strober W, editors. Mucosal immunology. Amsterdam: Elsevier, 2005:73-93.
- [8] Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. Cell Mol Life Sci 2005; 62: 2549-59.
- [9] Jenssen H, Hancock RE. Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie 2009; 91:19-29.
- [10] Puddu P, Valenti P, Gessani S. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. Biochimie 2009; 91: 11-8.
- [11] Fisher R, Debbabi H, Dubarry M, Boyaka P, Tomé D. Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin. Biochem Cell Biol 2006; 84:303-11.
- [12] Debbabi H, Dubarry M, Rautureau M, Tome D. Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic responses in mice. J Dairy Res 1998; 65:283-93.
- [13] Sfeir RM, Dubarry M, Boyaka PN, Rautureau M, Tomé D. The mode of oral bovine lactoferrin administration influences mucosal and systemic immune responses in mice. J Nutr 2004; 134:403-9.
- [14] Goldoni P, Sinibaldi L, Valenti P, Orsi N. Metal complexes of lactoferrin and their effect on the intracellular multiplication of Legionella pneumophila. Biometals 2000; 13:15-22.
- [15] Leitch EC, Willcox MD. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. J Med Microbiol 1999; 48: 867-71.
- [16] Naidu SS, Svensson U, Kishore AR, Naidu AS. Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:240-5.

- [17] Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BH, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J, Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A binding protein. *Infect Immun* 1994; 62:2628-32.
- [18] Drago Serrano ME. Actividades antibacterianas de la lactoferrina. *Enf Inf Microbiol* 2006;26:58-63.
- [19] Teraguchi S, Wakabayashi H, Kuwata H, Yamauchi K, Tamura Y. Protection against infections by oral lactoferrin: Evaluation in animal models. *Biometals* 2004; 17: 231-4.
- [20] Drago-Serrano ME, Flores-Romo L, Oliver Aguillón G, Jarillo Luna A, Reina Garfias H, Barbosa Cabrera E, Campos Rodríguez R. La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Bioquímica* 2008; 33: 71-82.
- [21] Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison III RT. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* 1993; 61:719-28.
- [22] Ellison RT III, Giehl TJ, La Force FM. Damage of the outer membrane of enteric gram negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun* 1988; 56: 2774-81.
- [23] Ellison RT III, Giehl TJ. Killing of Gram negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 1991; 88:1080-91.
- [24] Bessler HC, De Oliveira IR, Giugliano LG. Human milk glycoproteins inhibit the adherence of Salmonella typhimurium to HeLa cells. *Microbiol Immunol* 2006; 50:877-82.
- [25] Collins HL Kaufmann SH, Schiabile UE. Iron chelation via deferoximine exacerbates experimental salmonellosis via inhibition of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase dependent respiratory burst. *J Immunol* 2002; 168:3458-63.
- [26] Czirok E, Milch H, Nemeth K, Gado I. In vitro and in vivo (LD50) effects of human lactoferrin on bacteria. *Acta Microbiol Hung* 1990; 37:55-71.
- [27] Mosquito S, Ochoa TJ, Cok J, Cleary TG. Effect of bovine lactoferrin Salmonella ser. Typhimurium infection in mice. *Biometals* 2010; 23:515-21.
- [28] Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*. 1995; 80:252-67.
- [29] Masson PL, Heremans JF. Lactoferrin in milk from different species. *Comp Biochem Physiol* 1971; 39B: 119-29.
- [30] Martins CAP, Fonteles MG, Barret LJ, Guerrant RL. Correlation of lactoferrin with neutrophilic inflammation in body fluids. *Clin Diag Lab Immunol* 1995; 2:753-65.
- [31] Bennett RM, Bagby GC, Davis J. Calcium dependent polymerization of lactoferrin. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 101:88-95.
- [32] Masson PL, Heremans JF, Schonne E. Lactoferrin, an iron binding protein in neutrophilic leucocytes. *J Exp Med* 1969;130:643-58.
- [33] Bullen JJ, Armstrong JA. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunol* 1979; 36:781-91.

- [34] Britigan BE, Hassett DJ, Rosen GM, Hamill DR, Cohen MS. Neutrophil degranulation inhibits potential hydroxyl-radical formation. *Biochem J* 1989; 264:447-55.
- [35] Moore SA, Anderson BF, Groom CR, Haridas M, Baker EN. Three dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8Å resolution. *J Mol Biol* 1997; 274:222-36.
- [36] Steijens JM, van Hooijdonk ACM. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British J Nutr* 2000; 84:S11-S7.
- [37] Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:109-12.
- [38] Reyes Reyes RE, Manjarrez Hernández HA, Drago Serrano ME. El hierro y la virulencia bacteriana. *Enf Inf Microbiol* 2005; 25:104-7.
- [39] Bishop JG, Schanbacher FL, Ferguson LC, Smith L. In vitro growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apolactoferrin. *Infect Immun* 1976; 14: 911-8.
- [40] Griffiths E, Humphreys J. Bacteriostatic effect of human milk and bovine colostrum on Escherichia coli: importance of bicarbonate. *Infect Immun* 1977; 15:396-401.
- [41] Nonnecke BJ, Smith KL. Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated in vitro microassay of bacterial growth. *J Dairy Sci* 1984; 67: 606-13.
- [42] Aguila A, Herrera AG, Morrison D, Cosgrove B, Perojo A, Montesinos I, Perez J, Sierra G, Gemmel CG, Brock JH. Bacteriostatic activity of human lactoferrin against Staphylococcus aureus is a function of its iron binding properties and is not influenced by antibiotic resistance. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31:145-52.
- [43] Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun* 1980; 28:893-8.
- [44] Dionysius DA, Grieve PA, Milne JM. Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on Enterotoxigenic Escherichia coli. *J Dairy Sci* 1993; 76:2597-606.
- [45] Bortner CA, Miller RD, Arnold RR. Bactericidal effect of lactoferrin on Legionella pneumophila. *Infect Immun* 1986; 51:373-7.
- [46] Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from stasis of iron deprivation. *Infect Immun* 1982; 35; 792-9.
- [47] Ulvatne H, Samuelsen Ø, Haukland HH, Krämer M, Vorland LH. Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in Escherichia coli and Bacillus subtilis. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 237; 377-384.
- [48] Sallmann FR, Baveye-Descamps S, Pattus F, Salmon V, Branza N, Spik G, Legrand D. Porins OmpC and PhoE of Escherichia coli as specific cell surface targets human lactoferrin. Binding characteristics and biological effects. *J Biol Chem* 1999; 274:16107-14.

- [49] León-Sicairos N, Canizales-Román A, de la Garza M, Reyes-López M, Zazueta-Beltrán J, Nazmi K, Gómez Gil B, Bolscher JG. Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic Vibrio parahaemolyticus. *Biochimie* 2009; 91:133-40.
- [50] Ellison RT 3rd, LaForce FM, Giehl TJ, Boose DS, Dunn BE. Lactoferrin and transferring damage of the gram negative outer membrane is modulated by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *J Gen Microbiol* 1990; 136:1437-46.
- [51] Leitch EC, Willcox MD. Lactoferrin increases the susceptibility of S. epidermidis biofilms to lysozyme and vancomycin. *Curr Eye Res* 1999; 19:12-9.
- [52] Naidu AS, Arnold RR. Lactoferrin interaction with salmonellae potentiates antibiotic susceptibility in vitro. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 20:69-75.
- [53] de Araujo AN, Giugliano LG. Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. *BMC Microbiology* 2001; 1:25.
- [54] Willer EM, Lima RL, Giugliano LG. In vitro adhesion and invasion inhibition of Shigella dysenteriae, Shigella flexneri and Shigella sonnei clinical strains by human milk proteins. *BMC Microbiol* 2004; 4:18.
- [55] Kawasaki Y, Tazume S, Shimizu K, Matsuzawa H, Dosako S, Isoda H, et al. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of Escherichia coli to host cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64:348-54.
- [56] Ajello M, Greco R, Giansanti F, Massucci MT, Antonini G, Valenti P. Anti-invasive activity of bovine lactoferrin towards group A streptococci. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:119-24.
- [57] Gomez HF, Herrera Insua I, Siddiqui MM, Diaz-Gonzalez VA, Caceres E, Newburg DS, Cleary TG. Protective role of human lactoferrin against invasion of Shigella flexneri M90T. *Adv Exp Med Biol* 2001; 501:457-67.
- [58] Qiu J, Hendrixson DR, Baker EN, Murphy TF, St Geme JW 3<sup>rd</sup>, Plaut AG. Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by Haemophilus influenzae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12641-46.
- [59] Ochoa TJ, Cleary TG. Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *Biometals* 2004; 17:257-60.
- [60] Gomez HF, Ochoa TJ, Carlin LG, Cleary TG. Human lactoferrin impairs virulence of Shigella flexneri. *J Infect Dis* 2003; 187: 87-95.
- [61]. Kuwata H, Yip TT, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H, Tomita M, Hutchens TW. The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice. *Biochem J* 1998; 334: 321-3.
- [62] Fisher R, Debbabi H, Blais A, Dubarry M, Rautureau M, Boyaka P, Tome D. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues. *Int Immunopharmacol* 2007; 7:1387-93.

- [63] Ashida K, Sasaki H, Suzuki YA, Lönnerdal B. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals* 2004; 17: 311-5.
- [64] Suzuki YA, Lönnerdal B. Baculovirus expression of mouse lactoferrin receptor and tissue distribution in the mouse. *Biometals* 2004; 17: 301-9.
- [65] Nielsen SM, Hansen GH, Danielsen EM. Lactoferrin targets T cells in the small intestine. *J Gastroenterol* 2010 JUL 6 AHEAD PUBLICATION
- [66] Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood* 2008; 112:1557-69.
- [67] Takakura N, Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Influences of orally administered lactoferrin on IFN-g and IL-10 production by intestinal intraepithelial lymphocytes and mesenteric lymph node cells. *Biochem Cell Biol* 2006; 84:363-8.
- [68] Wakabayashi H, Takakura N, Yamauchi K, Tamura Y. Modulation of immunity related gene expression in small intestines of mice by oral administration of lactoferrin. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 239-45.
- [69] Iigo M, Shimamura M, Matsuda E, Fujita K, Nomoto H, Satch J, Kojima S, Alexander DB, Moore MA, Tsuda H. Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin 18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Cytokine* 2004; 25:36-44.
- [70] Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:50-63.
- [71] Wilk KM, Hwang SA, Actor JK. Lactoferrin modulation of antigen presenting cell response to BCG infection. *Postepy Hig Med Dosw (online)*. 2007; 61:277-82.
- [72] Actor JK, Hwang SA, Olsen M, Zimecki M, Hunter RL, Kruzel ML. Lactoferrin immunomodulation of DTH response in mice. *Int Immunopharmacol* 2002; 2:475-86.
- [73] Curran CS, Demick KP, Mansfield JM. Lactoferrin activates macrophages via TLR4 dependent and independent signaling pathways. *Cell Immunol* 2006; 242:23-30.
- [74] Spadaro M, Caorsi C, Ceruti P, Varadhachary A, Forni G, Pericle F, Giovarelli M. Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *FASEB J* 2008; 22:2747-57
- [75] Mikkelsen TL, Bakman S, Sørensen ES, Barkholt V, Frøkiaer H. Sialic acid containing milk proteins show differential immunomodulatory activities independent of sialic acid. *J Agric Food Chem* 2005; 53:7673-80.
- [76] Zimecki M, Mazurier J, Spik G, Kapp JA. Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunol* 1995; 86:122-7.
- [77] Britigan BE, Lewis TS, Waldschmidt M, McCormick ML, Krieg AM. Lactoferrin binds CpG containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *J Immunol* 2001; 167:2921-8.



- [78] Zimecki M, Mazurier J, Machnicki M, Wieczorek Z, Montreuil J, Spik G. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4-CD8- thymocytes. *Immunol Lett* 1991; 30:119-23.
- [79] Zimecki M, Mazurier J, Spik G, Kapp JA. Lactoferrin inhibits proliferative response and cytokine production of Th1 but not Th2 cell lines. *Arch Immunol Ther Exp* 1996; 44:51-6.
- [80] Dhennin Duthille I, Masson M, Damiens E, Fillebeen C, Spik G, Mazurier J. Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of mitogen activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line *J Cell Biochem* 2000; 79:583-93.
- [81] Suzuki YA, Lopez V, Lönnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 2560-75.
- [82] Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol* 2006; 84:282-90.
- [83] Kobayashi S, Sato R, Inanami O, Yamamori T, Yamato O, Maede Y, Sato J, Kuwabara M, Naito Y. Reduction of concanavalin A induced expression of interferon gamma by bovine lactoferrin in feline peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 105:75-84.
- [84] Penco S, Pastorino S, Bianchi-Scarrà G, Garrè C. Lactoferrin down modulates the activity of the granulocyte macrophage colony stimulating factor promoter in interleukin-1b stimulated cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 12263-8.
- [85] Oh SM, Hahm DH, Kim IH, Choi SY. Human neutrophil lactoferrin trans-activates the matrix metalloproteinase 1 gene through stress activated MAPK signaling modules. *J Biol Chem* 2001; 276: 42575-9.
- [86] Bi BY, Liu JL, Legrand D, Roche AC, Capron M, Spik G, Mazurier J. Internalization of human lactoferrin by the Jurkat human lymphoblastic T cell line. *Eur J Cell Biol* 1996; 69: 288-96.
- [87] Legrand D, Vigie K, Said EA, Ellass E, Masson M, Slomianny MC, Carpentier M, Briand JP, Mazurier J, Hovanessian AG. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur J Biochem* 2004; 271: 303-17.
- [88] Kawasaki Y, Tazume S, Shimizu K, Matsuzawa H, Dosako S, Isoda H, Tsukiji M, Fujimura R, Muranaka Y, Isihida H. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of Escherichia coli to host cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64:348-54.
- [89] Wang X, Hirno S, Willén R, Wadström T. Inhibition of Helicobacter pylori infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *J Med Microbiol* 2001;50:430-35.
- [90] Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee BH, et al. Potential antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with Listeria monocytogenes. *J Med Microbiol* 2005; 54:1049-54.
- [91] Zagulski T, Lipiński P, Zagulska A, Jarzabek Z. Antibacterial system generated by lactoferrin in mice in vivo is primarily a killing system. *Int J Exp Pathol* 1998; 79:117-23.

- [92] Edde L, Hipolito RB, Hwang FF, Headon DR, Shalwitz RA, Sherman MP. Lactoferrin protects neonatal rats from gut related systemic infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G1140-50.
- [93] Lima MF, Kierszenbaum F. Lactoferrin effects of phagocytic cell function. II. The presence of iron is required for lactoferrin molecule to stimulate intracellular killing by macrophage but not to enhance the uptake of particles and microorganisms *Immunol* 1987; 139:1647-51.
- [94] Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H. Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell Immunol* 1998; 187:34-7.
- [95] Gomez HF, Ochoa TJ, Herrera-Insua I, Carlin LG, Cleary TG. Lactoferrin protects rabbits from Shigella flexneri induced inflammatory enteritis. *Infect Immun* 2002; 70:7050-3.
- [96] Håversen LA, Engberg I, Baltzer L, Dolphin G, Hanson LÅ, Mattsby-Baltzer I. Human lactoferrin and peptides derived from a surface exposed helical region reduce experimental Escherichia coli urinary tract infection in mice. *Infect Immun* 2000; 68:5816-23.
- [97] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885-91.
- [98] Hwang SA, Kruzel ML, Actor JK. Lactoferrin augments BCG vaccine efficacy to generate T helper response and subsequent protection against challenge with virulent Mycobacterium tuberculosis. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 591-9.
- [99] Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer III JJ. Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori comb. nov. *J Clin Microbiol* 1989; 27:313-20.
- [100] Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Bäumlér AJ. Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. *Microb Infect* 2001; 3:1335-44.
- [101] Hormaeche CE. Natural resistance to Salmonella typhimurium in different inbred mouse strains. *Immunol* 1979; 37:311-8.
- [102] Hohmann AW, Schimdt G, Rowley D. Intestinal colonization and virulence of Salmonella in mice. *Infect Immun* 1978; 22:763-70.
- [103] Kingsley RA, Santos RL, Keestra AM, Adams LG, Bäumlér AJ. Salmonella enterica serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol* 2002; 43: 895-905.
- [104]. van der Velden AWM, Bäumlér AJ, Tsolis RM, Heffron F. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of Salmonella typhimurium in mice. *Infect Immun* 1998; 66: 2803-2808.
- [105] Murray RA, Lee CA. Invasion genes are not required for Salmonella enterica serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that Salmonella pathogenicity island I has alternative functions during infection. *Infect Immun* 2000; 68:5050-5.

- [106] Darwin KH, Miller VI. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. Clin Microbiol Rev 1999; 12:405-28.
- [107] Drago Serrano ME. Sistemas de adquisición de hierro en Salmonella enterica. Rev Biomed 2009; 20:41-54.
- [108] Carter PB, Collins FM. The route of enteric infection in normal mice. J Exp Med 1974; 139:1189-1203.
- [109] Jones BD, Ghorri N, Falkow S. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. J Exp Med 1994; 180:15-23.
- [110] Halle S, Bumann D, Herbrand H, Willer Y, Dähne S, Förster R, Pabst O. Solitary intestinal lymphoid tissue provides a productive port of entry for Salmonella enterica serovar Typhimurium. Infect Immun 2007; 75: 1577-85.
- [111] Sansonetti P. Host-pathogen interactions: the seduction of cross-talk. Gut 2002; 50 (Suppl III). Iii2-iii8.
- [112] Daniels JJD, Autenrieth IB, Ludwig A, Goebel W. The gene slyA of Salmonella typhimurium is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. Infect Immun 1996; 64:5075-84.
- [113] Bäuml AJ, Tsois RM, Valentine PJ, Fitch TA, Heffron F. Synergistic effect of mutations in invA and lpfC on the ability of Salmonella typhimurium to cause murine typhoid. Infect Immun 1997; 65:2254-9.
- [114] Srinivasan A, McSorley SJ. Activation of Salmonella specific immune responses in the intestinal mucosa. Arch Immunol Ther Exp 2006; 54:1-7.
- [115] Zeng H, Carlson AQ, Guo Y, Yu Y, Collier-Hyams LS, Madara JL, Gewirtz AT, Neish AS. Flagellin is the major pro-inflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella. J Immunol 2003; 171:3668-74.
- [116] Biedzka-Sarek M, Skurnik M. How to outwit the enemy: dendritic cells face Salmonella. APMIS 2006; 114:589-600.
- [117] Worley MJ, Nieman GS, Geddes K, Heffron F. Salmonella typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. Proc Natl Acad Sci 2006; 103:17915-20.
- [118] Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex. Infect Immun 1994; 62:2132-4.
- [119] Uematsu S, Ho Jang M, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sougawa N, Matsui H, Kuwata H, Hemmi H, Coban C, Kawai T, Ishii KJ, Takeuchi O, Miyasaka K, Takeda K, Akira S. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. Nat Immunol 2006; 7:868-74.

- [120] Mastroeni P, Skepper JN, Hormaeche CE. Effect of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on histopathology or primary *Salmonella* infections. *Infect Immun* 1995; 63:3674-82.
- [121] Mastroeni P, Sheppard M. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microb Infect* 2004; 6:398-405.
- [122] Dahlfors-Richter A, Buchan AMJ, Finlay BB. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 1997; 186:569-80.
- [123] Vázquez Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC. *Salmonella pathogenicity* island 2 dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 2000; 287:1655-8.
- [124] Tobar JA, Carreño LJ, Bueno SM, González PA, Mora JE, Quezada SA, Kalergis AM. Virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. *Infect Immun* 2006; 74:6438-48.
- [125] Srinivasan A, Foley J, Ravindran R, McSorley SJ. Low dose *Salmonella* infection evades activation of flagellin specific CD4 T cells. *J Immunol* 2004; 173:4091-9.
- [126] Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zähringer U, Brade H, Rietschel E, Dougan G, Charles IG, Maskell DJ. A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol Microbiol* 1998; 29:571-9.
- [127] Eckmann L, Kagnoff MF. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microb Infect* 2001; 3:1191-1200.
- [128] Wick MJ. Living in the danger zone: innate immunity to *Salmonella*. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7:51-7.
- [129] Lawley TD, Bouley DM, Hoy YE, Gerke C, Relman DA, Monack DM. Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and intestinal microbiota. *Infect Immun* 2008; 76:403-16.
- [130] Groisman EA, Parra-López C, Salcedo M, Lipps CJ, Heffron F. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11939-43.
- [131] Weiss DS, Raupach B, Takeda K, Akira S, Zychlisky A. Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J Immunol* 2004; 172:4463-9.
- [132] Rydström A, Wick MJ. Monocyte and neutrophil recruitment during oral *Salmonella* infection is driven by MyD88 derived cytokines. *Eur J Immunol* 2009; 39:3019-30.
- [133] Rydström A, Wick MJ. Monocyte recruitment, activation and function in the gut associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection. *J Immunol* 2007; 178: 5789-801.
- [134] De Paolo RW, Lathan R, Rollins BJ, Karpus WJ. The chemokine CCL2 is required for control of murine gastric *Salmonella enterica* infection. *Infect Immun* 2005; 73:6514-22.

- [135] Eriksson S, Chambers BJ, Rhen M. Nitric oxide produced by murine dendritic cells is cytotoxic for intracellular Salmonella enterica sv Typhimurium. *Scand J Immunol* 2003; 58:483-502.
- [136] Valdez Y, Diehl GE, Vallance BA, Grassl GA, Guttman JA, Brown NF, Rosenberger CM, Littman DR, Gros P, Finlay BB. Nramp1 expression by dendritic cells modulates inflammatory responses during Salmonella typhimurium infection. *Cell Microbiol* 2008; 10:1646-61.
- [137] Cherayil BJ, Antos D. Inducible nitric oxide synthase and Salmonella infection. *Microb Infect* 2001; 3:771-6.
- [138] Vidal S, Gros P, Skamene E. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 and the Bcg/Ity/Lsh locus. *J Leukoc Biol* 1995; 58:382-90.
- [139] Arnold JW, Niesel DW, Annable CR, Hess CB, Asuncion M, Cho YJ, Peterson JW, Klimpel GR. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates the early pathology in Salmonella infection of the gastrointestinal tract. *Microb Path* 1993; 14:217-27.
- [140] Raupach B, Peuschel SK, Monack DM, Zychlisky A. Caspase 1 mediated activation of interleukin 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 contributes to innate defenses against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2006; 74:4922-6.
- [141] Ramarathinam L, Shaban RA, Niesel DW, Klimpel GR. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) production by gut associated lymphoid tissue and spleen following oral Salmonella typhimurium challenge. *Microb Pathog* 1991; 11:347-56.
- [142] Dybing JK, Walters M, Pascual DW. Role of endogenous interleukin-18 in resolving wild type and attenuated Salmonella typhimurium infections. *Infect Immun* 1999; 67:6242-8.
- [143] Wick MJ. Monocyte and dendritic recruitment and activation during oral Salmonella infection. *Immunol Lett* 2007; 112: 68-74.
- [144] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunol* 2004; 5: 987-95.
- [145] Salazar Gonzalez RM, Niess JM, Zammit D, Ravindran R, Srinivasan A, Maxwell J, Stoklasek T, Yadav R, Williams IR, Gu X, McCormick BA, Pazos MA, Vella TA, Lefrancois L, Reinecker HC, McSorley SJ. CCR6 mediated dendritic cell activation of pathogen specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* 2006; 24:623-32.
- [146] McSorley SJ, Asch S, Costalonga M, Reinhardt RL, Jenkins MK. Tracking Salmonella specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated infection. *Immunity* 2002; 16:365-77.
- [147] Cummings LA, Rassoulain SL, Wilkerson WD, Fellnerova I, Cookson BT. FliC specific CD4+T cells responses are restricted by bacterial regulation of antigen expression. *J Immunol* 2005; 174:7929-38.
- [148] Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from gastrointestinal tract. *Infect Immun* 1994; 62: 2874-84.

- [149] Okahashi N, Yamamoto M, Vancott JL, Chatfield SN, Roberts M, Bluethmann H, Hiroi T, Kiyono H, McGhee JR. Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant Salmonella strain or cholera toxin reveals that CD4+ Th2 cell producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect Immun* 1996; 64: 1516-25.
- [150] VanCott JL, Staats HF, Pascual DW, Roberts M, Chatfield SN, Yamamoto M, Coste M, Carter PB, Kiyono H, McGhee JR. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant Salmonella. *J Immunol* 1996; 156:1504-14.
- [151] Martinoli C, Chiavelli A, Rescigno M. Entry route of Salmonella typhimurium directs the type of induced immune response. *Immunity* 2007; 27:975-84.
- [152] Hashizume T, Togawa A, Nochi T, Igarashi O, Kweon M, Kiyono H, et al. Peyer's patches are required for intestinal immunoglobulin A responses to Salmonella spp. *Infect Immun* 2008;76:927-34.
- [153] Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal secretory immunoglobulin IgA protects mice against oral challenge with the invasive pathogen Salmonella typhimurium. *Infect Immun* 1992; 60:1786-92.
- [154] Shope SR, Schiemann DA. Passive secretory immunity against Salmonella typhimurium demonstrated with foster mouse pups. *J Med Microbiol* 1991; 35:53-9.
- [155] Wijburg O, Uren TK, Simpfendorfer K, Johansen FE, Brandtzaeg P, Strugnell RA. Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella typhimurium infection. *J Exp Med* 2006; 203: 21-6.
- [156] Magnusson KE, Stjernström I. Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (SIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes. *Immunol* 1982; 45:239-48.
- [157] Lamm M. 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51:311-40.
- [158]. Mastroeni P. Immunity to systemic Salmonella infections. *Curr Mol Med* 2002; 2:393-406.
- [159] Mittrücker HW, Kaufmann HE. Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *J leukoc Biol* 2000; 67:457-63.
- [160] Warren J, Mastroeni P, Dougan G, Noursadeghi M, Cohen J, Walport MJ, Botto M. Increased susceptibility of C1q deficient mice to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2002; 70:551-7.
- [161] Geddes K, Cruz III F, Heffron F. Analysis of cells targeted by Salmonella type III secretion in vivo. *PLoS Pathog* 2007; 3:2017-28.
- [162] Conlan JW. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections by Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium and Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* 1997; 65:630-5.

- [163] Conlay JW. Neutrophils prevent extracellular colonization of the liver microvasculature by Salmonella typhimurium. *Infect Immun* 1996; 64:1043-7.
- [164] Kirby AC, Yrlid U, Wick MJ. The innate immune response differs in primary and secondary Salmonella infection. *J Immunol* 2002; 169:4450-9.
- [165] Mastroeni P, Vazquez Torres A, Fang FC, Xu Y, Khan S, Hormaeche CE, Dougan G. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival. *J Exp Med* 2000; 192:237-47.
- [166] Lalmanach AC, Montage A, Menanteau P, Lantier F. Effect of the mouse Nramp1 genotype on the expression of INF-g gene in early response to Salmonella infection. *Microb Infect* 2001; 3:639-44.
- [167] Bihl F, Salez L, Beaubier M, Torres D, Larivière L, Laroche L, Benedetto A, Martel D, Lapointe JM, Ryffel B, Malo D. Overexpression of toll like receptor 4 amplifies the host response to lipopolysaccharide and provides a survival advantage in transgenic mice. *J Immunol* 2003; 170:6141-50.
- [168] Talbot S, Töttemeyer S, Yamamoto M, Akira S, Huges K, Gray D, Barr T, Mastroeni P, Maskell DJ, Bryant CE. Toll like receptor 4 signalling through MyD88 is essential to control Salmonella enterica serovar Typhimurium infection, but not for the initiation of bacterial clearance. *Immunology* 2009; 128:472-83.
- [169] Lembo A, Kalis CH, Kirschning CJ, Mitolo V, Jirillo E, Wagner H, Galanos CH, Freudenberg MA. Differential contribution of toll like receptors 4 and 2 to the cytokine response to Salmonella enterica serovar Typhimurium and Staphylococcus aureus in mice. *Infect Immun* 2003; 71:6058-62.
- [170] Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galán JE, Flavell RA, Alexopoulou L. Involvement of toll like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Acad Nat Sci USA* 2006; 103:12487-92.
- [171] Alam MS, Akaike T, Okamoto S, Kubota T, Yoshitake J, Sawa T, Miyamoto Y, Tamura F, Maeda H. Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. *Infect Immun* 70: 3130-42.
- [172] Khan SA, Strijbos PJLM, Everest P, Moss D, Stratford R, Mastroeni P, Allen J, Servos S, Charles IG, Dougan G, Maskell DJ. Early responses to Salmonella typhimurium infection in mice occur at focal lesions in infected mice. *Microb Pathog* 2001; 30:29-38.
- [173] Mastroeni P, Harrison JA, Robinson JH, Clare S, Khan S, Maskell DJ, Dougan G, Hormaeche CE. Interleukin 12 is required for control of the growth of attenuated aromatic compound dependent Salmonellae in BALB/c mice: role of gamma interferon and macrophage activation. *Infect Immun* 1998; 66:4767-76.
- [174] Nauciel CH, Espinasse Maes F. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. *Infect Immun* 1992; 60:450-4.

- [175] Kagaya K, Watanabe K, Fukuzawa Y. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for Salmonella killing activity. *Infect Immun* 1989; 57:609-15.
- [176] Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H, Kurimoto M, Dougan G. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent Salmonella typhimurium. *Infect Immun* 1999; 67:478-83.
- [177] Vazquez Torres A, Vallance BA, Bergman MA, Finlay BB, Cookson BT, Jones Carson J, Fang FC. Toll like receptor 4 dependence of innate and adaptive immunity to Salmonella: Importance of Kupffer cell network. *J Immunol* 2004; 172:6202-8.
- [178] O'brien GC, Wang JH, Redmond HP. Bacterial lipoprotein induces resistance to Gram negative sepsis in TLR4 deficient mice via enhanced bacterial clearance. *J Immunol* 2005; 174:1020-6.
- [179] Barr TA, Brown S, Mastroeni P, Gray D. TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to *Salmonella enterica*. *J Immunol* 2010; 185:2783-9.
- [180] Srinivasan A, Salazar González RM, Jarcho M, Sandau MM, Lefrancois L, McSorley SJ. Innate activation of CD4 T cells in Salmonella infected mice is dependent on IL-18. *J Immunol* 2007; 178:6342-9.
- [181] Mastroeni P, Villareal Ramos B, Hormaeche CE. Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro-Salmonella vaccines. *Microb Pathog* 1992; 13:477-91.
- [182] Yrlid U, Svensson M, Håkansson A, Chambers BJ, Ljungren HG, Wick MJ. In vivo activation of dendritic cells and T cells during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2001; 69:5726-35.
- [183] Al ramadi BK, Fernandez Cabezudo MJ, Ullah A, El Hasasna H, Flavell RA. CD154 is essential for protective immunity in experimental Salmonella infection: evidence for a dual role in innate and adaptive responses. *J Immunol* 2006; 176:496-506.
- [184] McSorley SJ, Jenkins MK. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Infect Immun* 2000; 68:3344-8.
- [185] Hess J, Ladel C, Miko D, Kaufmann SHE. *Salmonella typhimurium* aroA- infection in gene targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR alpha beta cells and IFN gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol* 1996; 156:3321-6.
- [186] Ravindran R, Foley J, Stoklasek T, Glimcher LH, McSorley SJ. Expression of T-bet by CD4 T cells is essential for resistance to Salmonella infection. *J Immunol* 2005; 174:4603-10.
- [187] Nauciel C, Ronco E, Guenet JL, Pla M. Role of H-2 and non H-2 genes in control of bacterial clearance from spleen in Salmonella typhimurium infected mice. *Infect Immun* 1988; 56:2407-11.



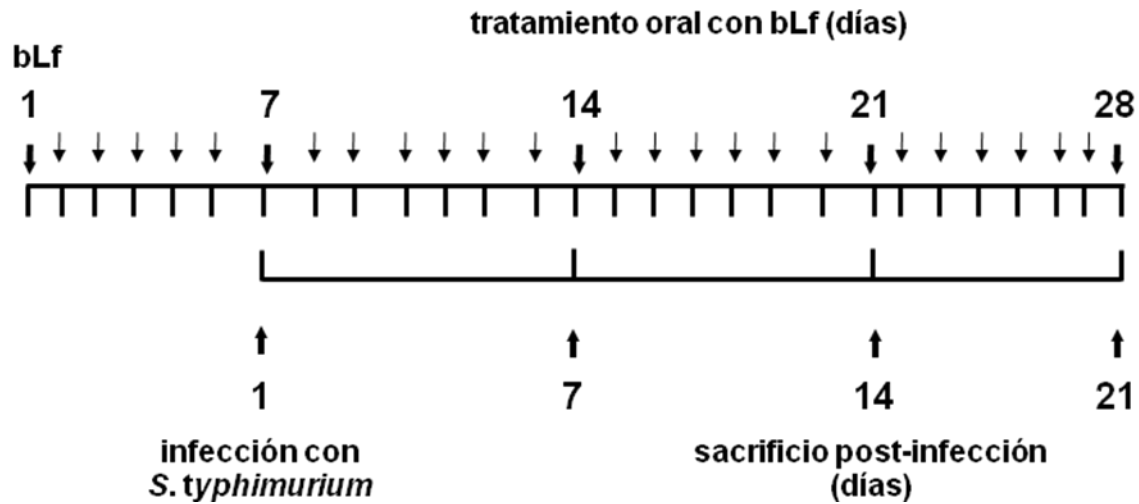
- [188] Mittrücker HW, Köhler A, Kaufmann SHE. Characterization of the murine T lymphocyte response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2002; 70:199-203.
- [189] Mittrücker HW, Raupach B, Köhler A, Kaufmann SHE. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against Salmonella typhimurium infection. *J Immunol* 2000; 164:1648-52.
- [190] Ugrinovic S, Ménager N, Goh N, Mastroeni P. Characterization and development of T cell immune responses in B cells deficient (Igh6<sup>-/-</sup>) mice with Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2003; 71:6808-19.
- [191] Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Hormaeche CE. Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent Salmonella in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect Immun* 1993; 61:3981-4.
- [192] Harrison JA, Villarreal-Ramos B, Mastroeni P. Correlates of protection induced by live Aro<sup>-</sup> Salmonella typhimurium vaccines in the murine typhoid model. *Immunology* 1997; 90:618-25.
- [193] Cunningham AF, Gaspal F, Serre K, Mohr E, Henderson IR, Scott-Tucker A, et al. Salmonella induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection. *J Immunol* 2007; 178:6200-7.
- [194] Stendahl O, Tagesson C, Magnusson KE, Edebo L. Physicochemical consequences of opsonization of Salmonella typhimurium with hiperimmune IgG and complement. *Immunol* 1977; 32:11-8.
- [195] Uppington H, Menager N, Boross P, Wood J, Sheppard M, Verbeek S, et al. Effect of immune serum and role of individual Fc $\gamma$  receptors on the intracellular distribution and survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium in murine macrophages. *Immunology* 2006; 119:147-58.
- [196] Akeda H, Mitsuyama M, Tatsukawa K, Nomoto K, Takeya K. The synergistic contribution of macrophages and antibody to protection against Salmonella typhimurium during the early phase of infection. *J Gen Microbiol* 1981; 123:209-14.
- [197] Paik G, Suggs MT. Reagents, stains, and miscellaneous test procedures. In: Lennette EH, Spaulding EH, Truant JP, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology 1974: 930-50.
- [198] Campos Rodríguez R, Quintanar Stephano R, Jarillo Luna RA, Oliver Aguillón G, Ventura Juárez J, Rivera Aguilar V, Berczi I, Kovacs K. Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy reduce serum immunoglobulin M (IgM) and IgG and intestinal IgA responses to Salmonella enterica serovar Typhimurium in rats. *Infect Immun* 2006; 74:1883-9.
- [199] Towbin H, Satquet T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4.
- [200] Heithoff DM, Sinsheimer RL, Low DA, Mahan MJ. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* 1999; 284:967-70.

[201] Matsiota-Bernard P, Mahana W, Avrameas S, Nauciel C. Specific and natural antibody production during Salmonella typhimurium infection in genetically susceptible and resistant mice. Immunology 1993; 79:375-80.

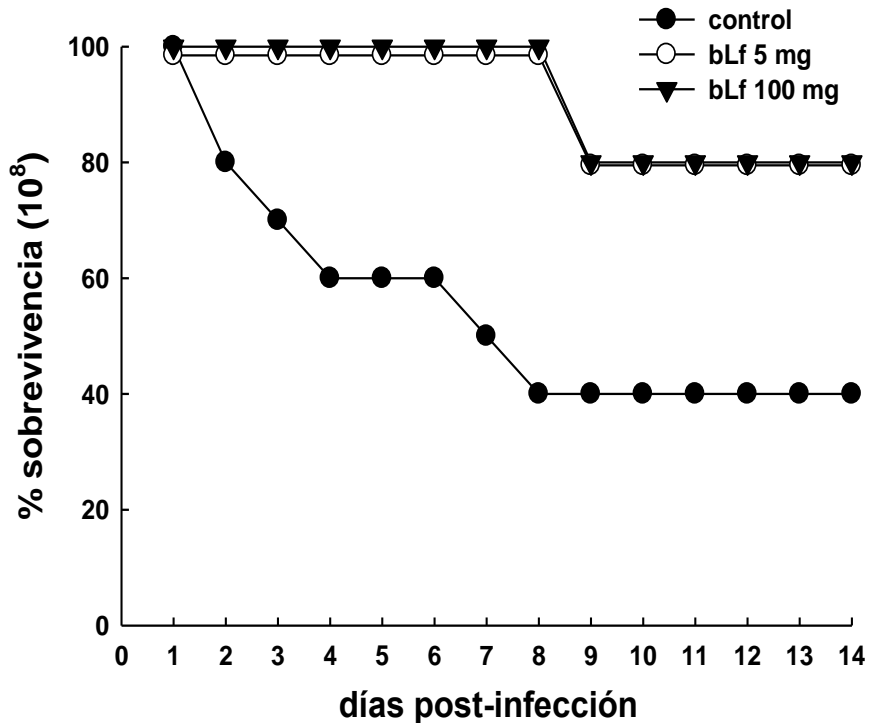
[202] Teraguchi S, Shin K, Ogata T, Kingaku M, Kaino A, Miyauchi H, Fukuwatari Y, Shimamura S. Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 4131-4.

[203] Mestecky J, Russel MW. Specific antibody reactivity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to protective activity of S-IgA at mucosal surfaces. Immunol Lett 2009; 124:57-62.

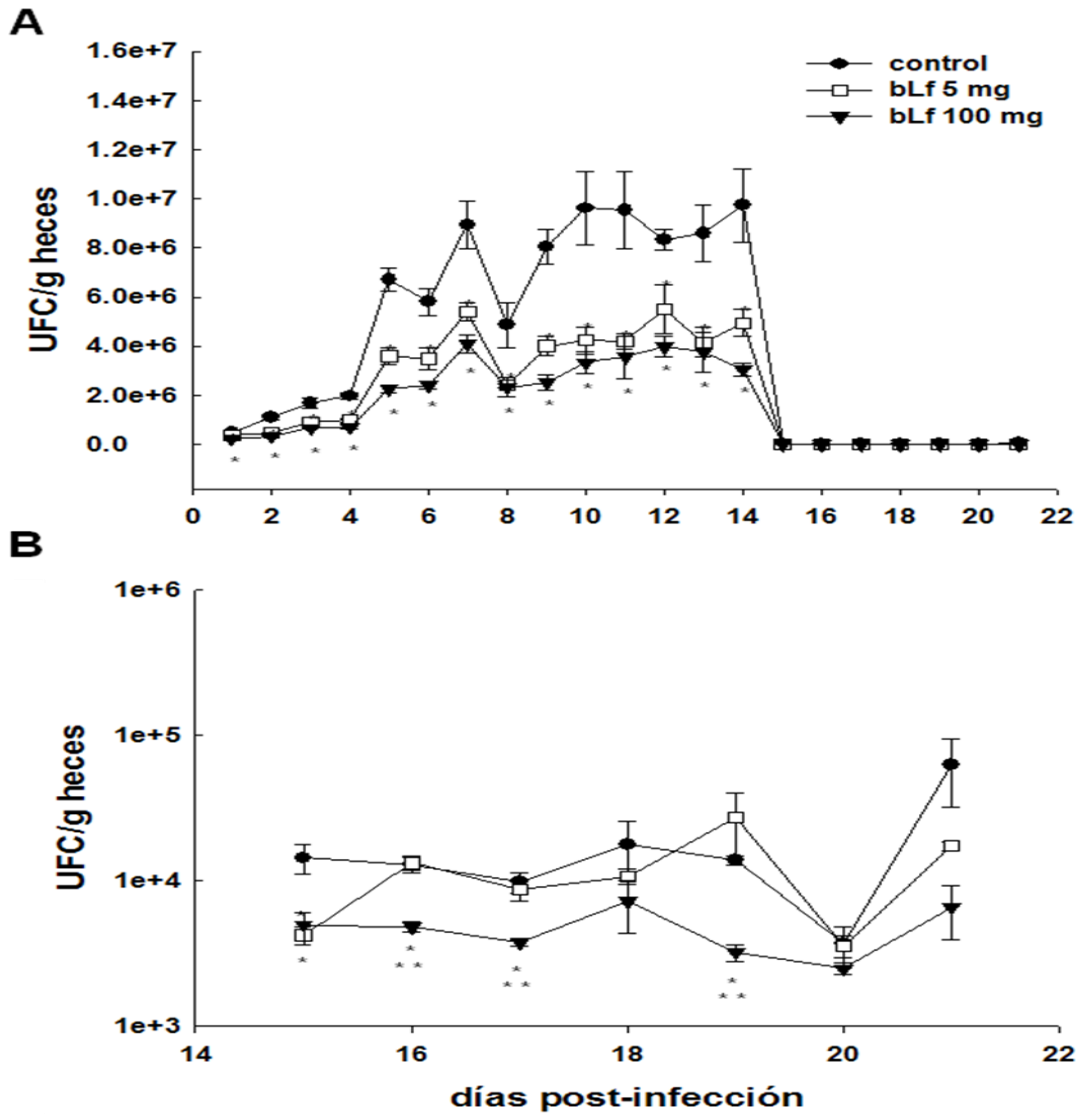
## X. Figuras



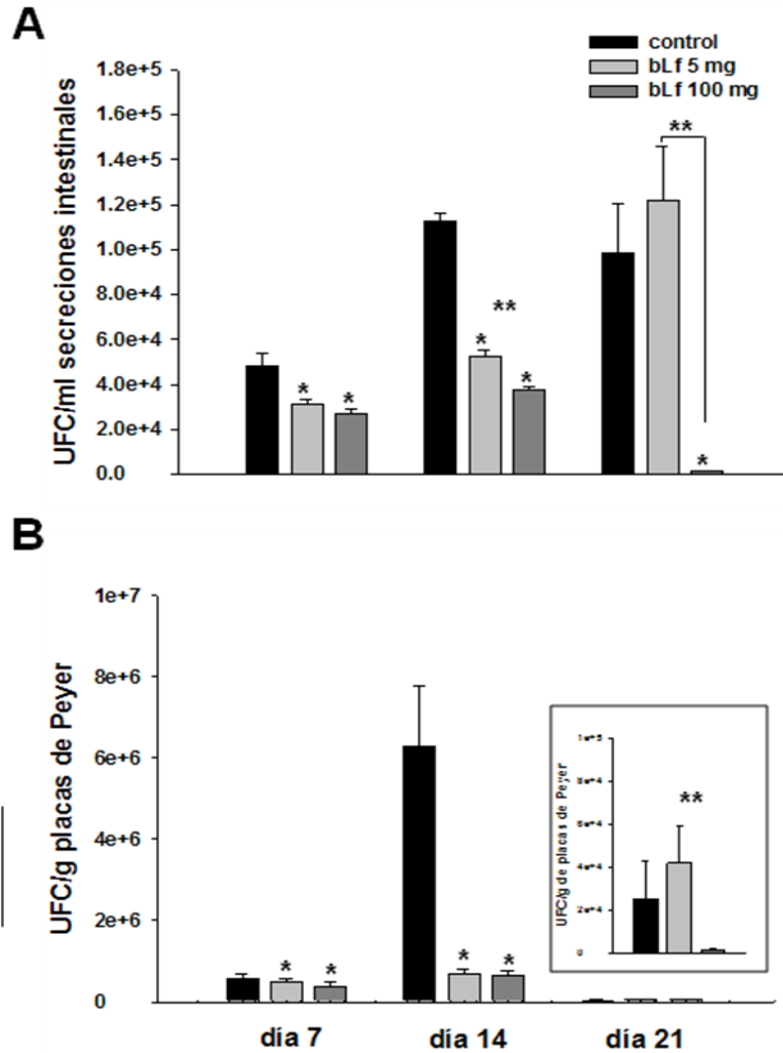
**Figura 1.** Diseño experimental: ratones Balb/c fueron tratados con lactoferrina bovina (bLf) e infectados con *S. typhimurium*. Dos grupos cada uno con 15 ratones fueron tratados por 7 días con 5 ó 100 mg de bLf. En el día 7 de tratamiento con bLf, los ratones fueron infectados por vía intragástrica con una dosis subletal de  $10^4$  UFC de *S. typhimurium*. Un grupo de 15 ratones tratado con solución salina estéril e infectado con  $10^4$  UFC de *S. typhimurium* fue incluido como grupo control infectado. De los días 1 al 21 post-infección, se llevaron a cabo tanto el tratamiento de los ratones con la bLf (o solución salina estéril) como la recolección diaria de materia fecal. Cinco ratones de cada grupo se sacrificaron en los días 7, 14 ó 21 después de la infección con el fin de recolectar muestras de suero, líquido intestinal, bazo e hígado. Además, tres grupos de 15 ratones no infectados tratados por 7, 14 o 21 días con 5 ó 100 mg de bLf, o con solución salina estéril, se incluyeron como grupos control.



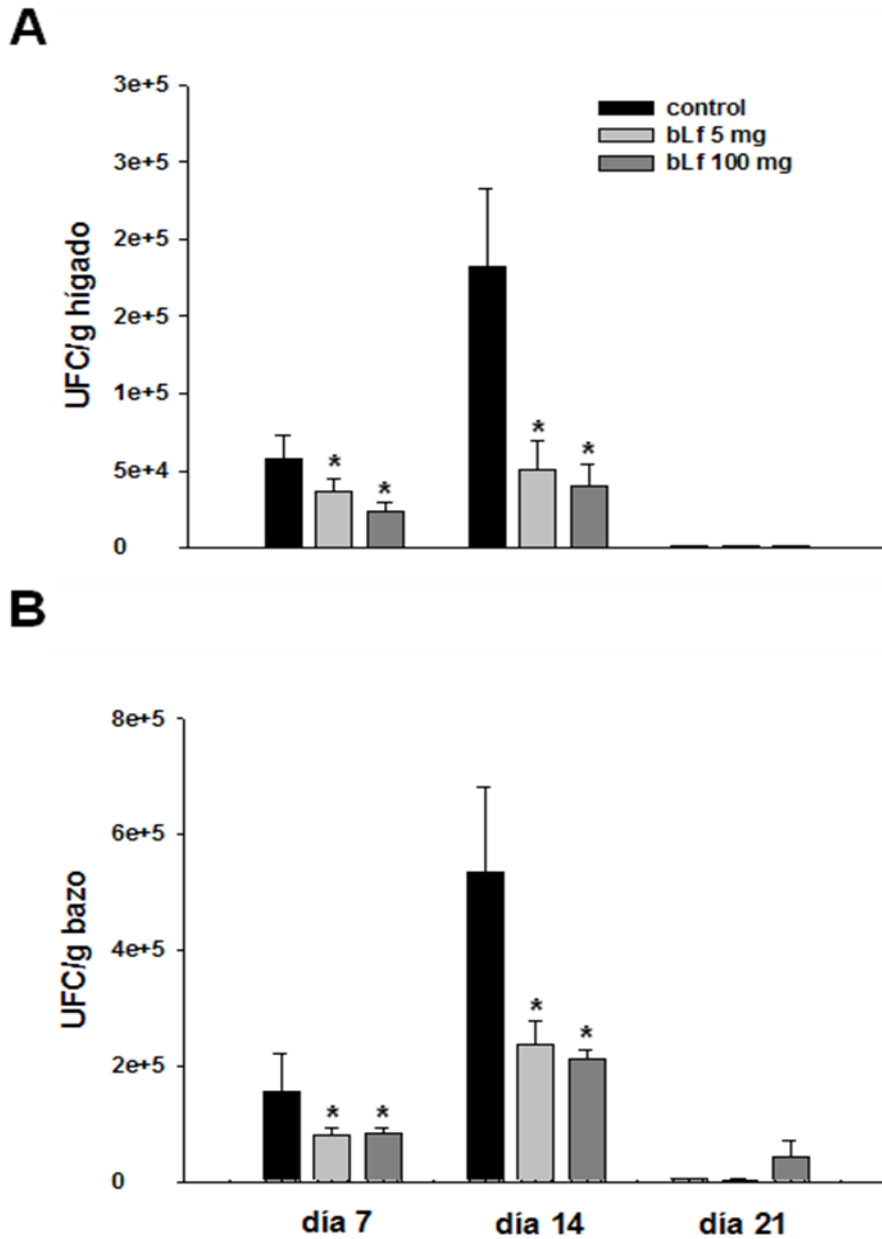
**Figura 2** Grado de sobrevivencia tras la infección intragástrica de ratones con una dosis letal de  $10^8$  UFC de *S. typhimurium*. Durante 21 días dos grupos de 10 animales cada uno fueron tratados por vía oral con dosis diferentes de bLf (5 ó 100 mg) y el grupo control recibió solución salina estéril. En el día 7 post-tratamiento con bLf (o solución salina estéril), todos los ratones se infectaron por vía intragástrica con una dosis letal de  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. typhimurium*. La mortalidad se registró diariamente durante los 14 días post-infección. La  $DL_{50}$  con  $10^5$  UFC de este patógeno administrada por vía oral en ratones Balb /C 14028 ha sido descrita previamente [200].



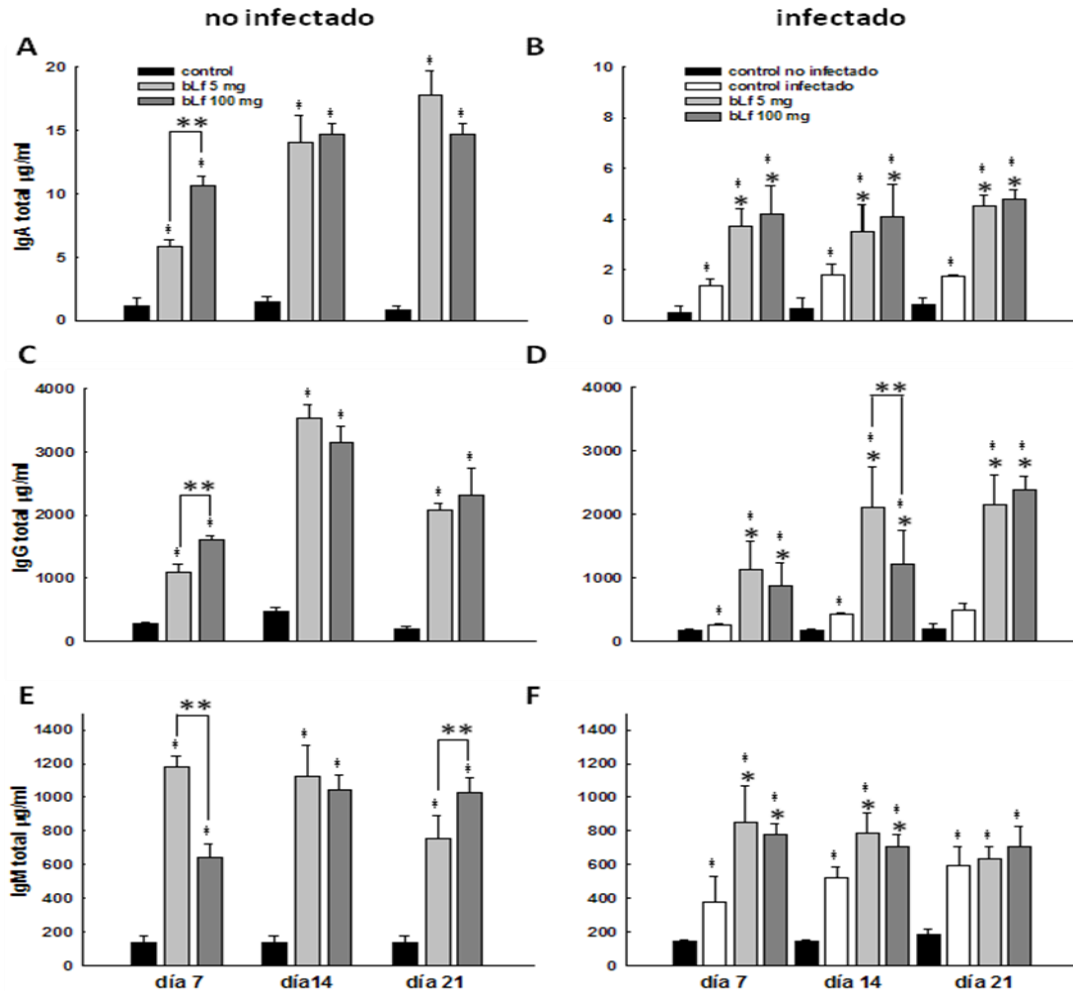
**Figura 3** Eliminación bacteriana medida en UFC / g de heces de los ratones tratados con bLf e infectadas con *S. typhimurium*. Tres grupos de 15 ratones cada uno, fueron tratados por vía oral con bLf (5 ó 100 mg) o con solución salina estéril (grupo control infectado) durante 7 días. Todos los ratones fueron entonces infectados por vía intragástrica con una dosis subletal de  $10^4$  UFC de *S. typhimurium*. A partir de entonces, la administración de bLf y la cosecha de heces se llevaron a cabo durante 7, 14 o 21 días post-infección. Los datos (UFC / g heces) se expresan como la media  $\pm$  error estándar de 15 ratones (7 días post-infección), 10 ratones (14 días post-infección) ó 5 ratones (21 días post-infección) por grupo. Eliminación fecal en UFC / g en heces de los días 1 a 14 post-infección, o de los días 15 a 21 post-infección se representan en el panel (A) y (B), respectivamente. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en relación con el grupo control infectado (\*) o entre los grupos tratados con bLf (\*\*).



**Figura 4.** Carga bacteriana en las secreciones intestinales y la colonización bacteriana de PP en los ratones tratados con bLf e infectados con *S. typhimurium*. Tres grupos de 15 ratones cada uno, fueron tratados por vía oral con bLf (5 ó 100 mg) o solución salina estéril (grupo control infectado), y subletalmente infectados con *S. typhimurium*, de acuerdo con el diseño experimental descrito en la Fig. 1. Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados para recoger las secreciones intestinales y las PP en los días 7, 14 y 21 post-infección. La carga bacteriana fue reportada como UFC / ml de secreciones intestinales (A) y la colonización bacteriana se reportó en UFC / g de PP (B). Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de los resultados de 5 ratones por grupo en los días 7, 14 y 21 post-infección. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en relación con el grupo control infectado (\*) o entre los grupos tratados con bLf (\*\*).

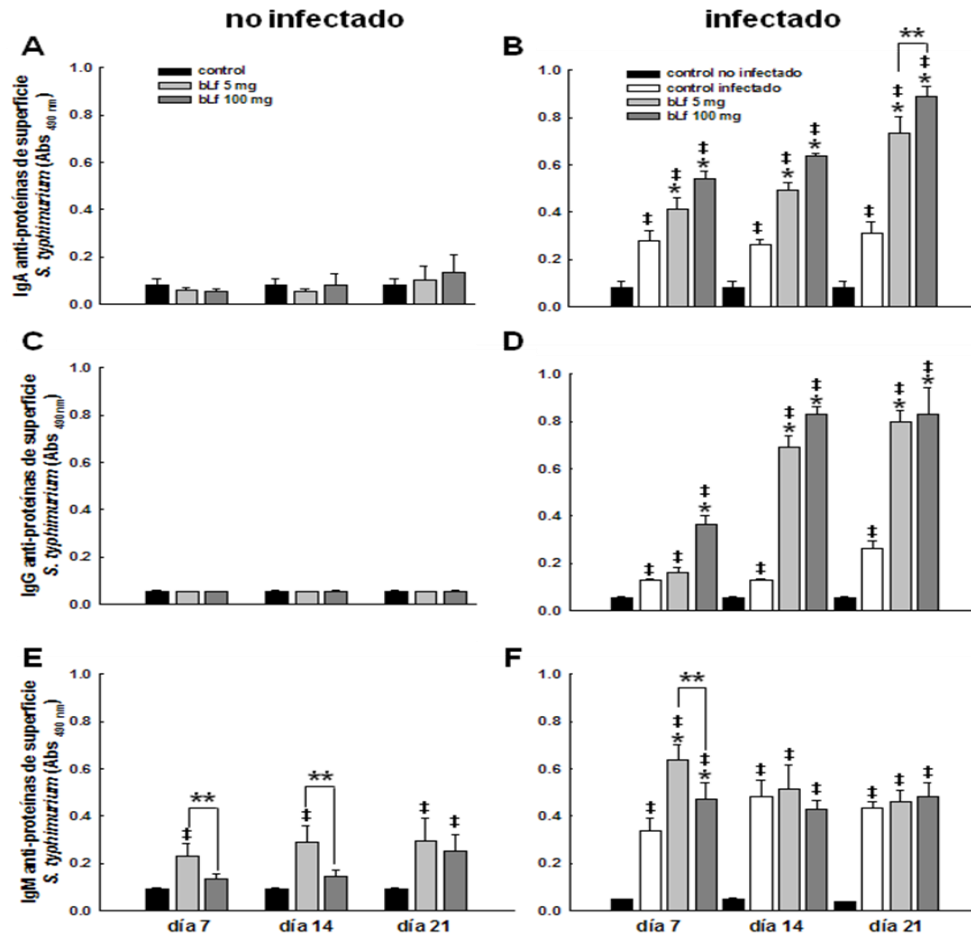


**Figura 5** Translocación bacteriana hacia el hígado y el bazo de los ratones tratados con bLf e infectadas con *S. typhimurium*. Tres grupos de 15 animales cada uno fueron tratados por vía oral con bLf (5 ó 100 mg) o una solución salina estéril, y subletalmente infectados con *S. typhimurium*. Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados para obtener muestras de hígado y bazo en los días 7, 14 y 21 post-infección. La translocación bacteriana en el hígado (A) y bazo (B) se expresó como UFC / g de tejido. Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de los resultados de 5 ratones por grupo en los días 7, 14 y 21 post-infección. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en relación con el grupo control infectado (\*).

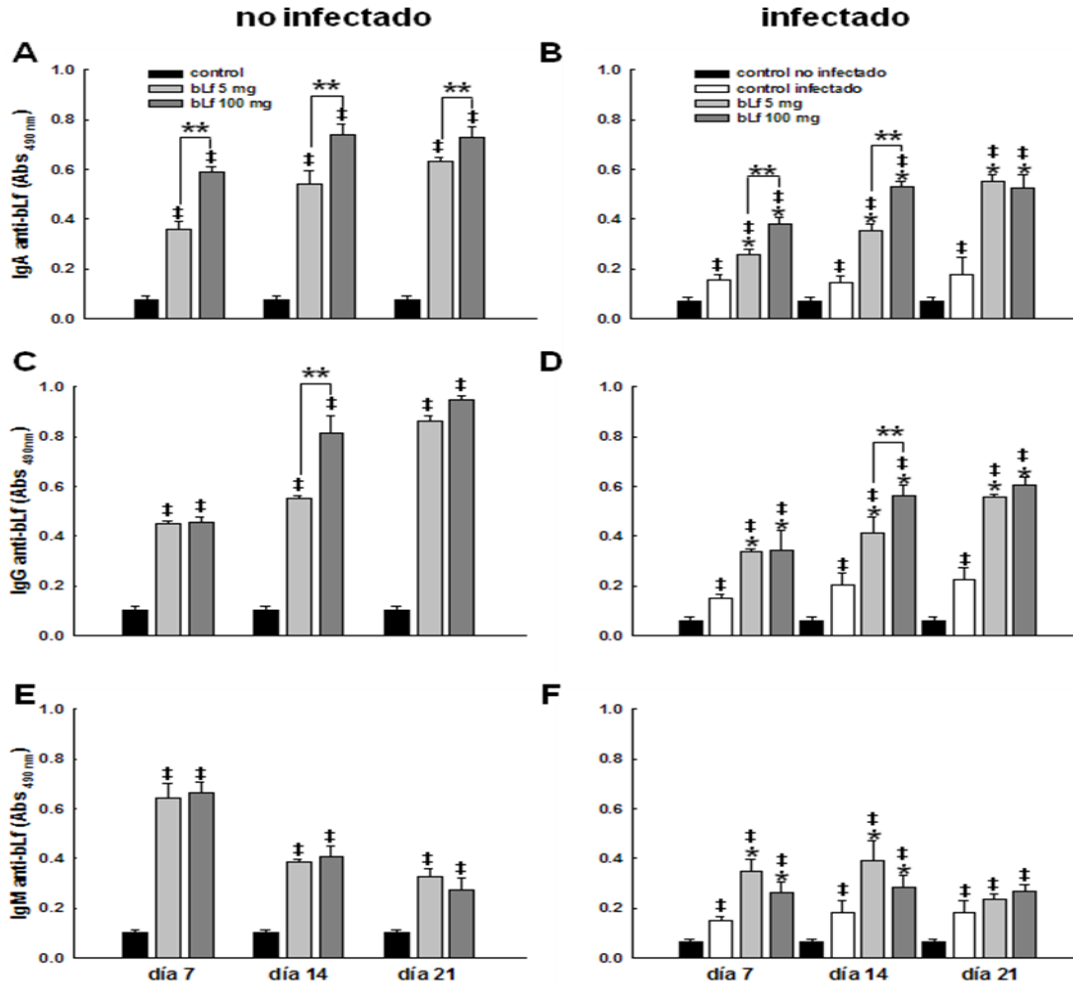


**Figura 6.** Niveles totales de anticuerpos IgA en las secreciones intestinales e IgG e IgM en suero de todos los grupos de ratones. Tres grupos de 15 ratones no infectados fueron tratados por vía oral diariamente con bLF (5 ó 100 mg) o con una solución salina estéril durante 7, 14 ó 21 días. Otros tres grupos de 15 ratones fueron tratados 7 días con bLf (5 ó 100 mg) o con salina estéril antes de ser subletalmente infectados con *S. typhimurium*. El tratamiento con bLf o salina continuó 21 días post-infección. Cinco ratones de cada grupo se sacrificaron en los días 7, 14 o 21 post-tratamiento con bLf o post-infección por *S. typhimurium* para recoger las secreciones intestinales y suero. IgA total en las secreciones intestinales no infectados (A) y de ratones infectados (B), IgG total de suero de ratones no infectados (C) y de ratones infectados (D), e IgM total en el suero de ratones no infectados (E) y de los ratones infectados (F) se muestran en  $\mu\text{g}$  por ml. Las barras de datos expresan la media  $\pm$  desviación estándar de los resultados de 5 ratones por grupo en los días 7, 14 y 21 post-tratamiento con bLf o post-infección. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en relación con el grupo control no infectado (‡), con el grupo control infectado (\*), o entre los grupos tratados con bLf (\*\*).





**Figura 7.** Niveles de IgA, IgG e IgM contra las proteínas de superficie de *S. typhimurium* en las secreciones intestinales y suero de todos los grupos de ratones. Tres grupos de 15 ratones no infectados fueron diariamente tratados vía oral con bLf (5 ó 100 mg) o una solución salina estéril durante 7, 14 ó 21 días. Otros tres grupos de 15 ratones fueron tratados 7 días con bLf (5 ó 100 mg) o con salina estéril antes de ser subletalmente infectados con *S. typhimurium*. El tratamiento con bLf o salina continuó 21 días post-infección. Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados en el día 7, 14 o 21 post-tratamiento con bLf o post-infección por *S. typhimurium* para recoger las secreciones intestinales y suero. Las barras de datos expresan la media  $\pm$  SD de los valores de absorbancia medida a 490 nm de las muestras de 5 ratones por grupo. IgA contra las proteínas de la superficie de *Salmonella* en las secreciones intestinales de ratones no infectados (A) y los ratones infectados (B), IgG contra las proteínas de superficie de *Salmonella* en el suero de ratones no infectados (C) y de los ratones infectados (D), e IgM contra las proteínas de la superficie de *Salmonella* en el suero de ratones no infectados (E) e infectados (F). Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en relación con el grupo control no infectado (‡), con el grupo control infectado (\*), o entre los grupos tratados con bLf (\*\*).



**Figura 8.** Niveles de IgA, IgG e IgM contra bLf en las secreciones intestinales y suero de todos los grupos de ratones. Tres grupos de 15 ratones no infectados fueron tratados por vía oral diariamente con bLf (5 ó 100 mg) o una solución salina estéril de 7, 14 ó 21 días. Otros tres grupos de 15 ratones fueron tratados 7 días con bLf (5 ó 100 mg) o con salina estéril antes de ser subletalmente infectados con *S. typhimurium*. El tratamiento con bLf o salina continuó 21 días post-infección. Cinco ratones de cada grupo se sacrificaron en los días 7, 14 o 21 post-tratamiento con bLf o post-infección por *S. typhimurium* para recoger las secreciones intestinales y suero. Las barras de datos expresan la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de absorbancia medida a 490 nm de las muestras de 5 ratones por grupo. IgA contra bLf en las secreciones intestinales de ratones no infectados (A) y los ratones infectados (B), IgG contra bLf en suero de ratones no infectados (C) y de ratones infectados (D), e IgM contra bLf de suero de ratones no infectados (E) de ratones infectados (F). Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en relación con el grupo control no infectado (‡), al grupo control infectado (\*), o entre los grupos tratados con bLf (\*\*).