

## Lactoferrina bovina disminuye la invasión de *Salmonella enterica* en células HEP-2

Bovine lactoferrin decreases the invasion of *Salmonella enterica* to HEP-2 cells

Liz J. Barreto Arce<sup>1</sup>, Carmen A. Contreras García<sup>2</sup>, David Durand Vara<sup>2</sup>, Theresa Ochoa Woodell<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

Recibido: 04-02-2016

Aprobado: 22-07-2016

### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar el efecto de la lactoferrina bovina (Lfb) en el proceso de invasión de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium en células HEP-2. **Materiales y métodos:** Se infectaron células HEP-2 con 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonia (UFC) de la bacteria en ausencia y presencia de 1 y 10 mg/mL de Lfb (saturada con hierro) durante 1,5 horas a 37°C. En este estudio evaluamos 2 tratamientos: pre-infección (las células HEP-2 se incubaron con Lf 1 hora, previo a la infección con *Salmonella*) y post-infección (la Lfb se adicionó 15 minutos después de la infección). La capacidad de invasión de *Salmonella* se determinó mediante la cuantificación de las UFC recuperadas desde el interior de las células HEP-2 (después del tratamiento con 100 µg/mL y 10 µg/mL de gentamicina y Triton X-100). **Resultados:** En el tratamiento pre-infección se observó una disminución de 23% en la invasión de *Salmonella* cuando las células HEP-2 fueron pre-incubadas con 1 mg/mL de Lfb (2,8x10<sup>5</sup> vs 2,1x10<sup>5</sup>, p=0,04) y una disminución de 50% cuando fueron pre-incubadas con 10 mg/mL de Lfb (2,8x10<sup>5</sup> vs 1,4x10<sup>5</sup>, p=0,04). Con el tratamiento post-infección no se observaron cambios en la capacidad de invasión de *Salmonella*. **Conclusiones:** Los resultados indican que Lfb reduce la capacidad de invadir de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium a células HEP-2 en el tratamiento pre-infección.

**Palabras clave:** *Salmonella*; Lactoferrina; Infecciones por *Salmonella*; Diarrea (fuente: DeCS BIREME).

### ABSTRACT

**Objective:** To assess the effect of bovine lactoferrin (bLf) on the invasion of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium to HEP-2 cells. **Materials and methods:** HEP-2 monolayers were infected with 10<sup>6</sup> colony forming unit (CFU) of bacteria in the absence and presence of 1 and 10 mg/mL of bLf (iron-saturated) and incubated 1.5 hours at 37°C. Two treatments were evaluated: pre-infection (HEP-2 cells were incubated with bLf one hour prior to infection with *Salmonella*) and post-infection (bLf was added 15 minutes after the infection). Invasiveness of *Salmonella* was determined through quantification of CFU recovered from inside the HEP-2 cells (after treatment with 100 µg/mL and 10 µg/mL of gentamicin and Triton X-100). **Results:** In the pre-infection treatment, we observed a decrease of 23% of *Salmonella* invasion when HEP-2 cells were pre incubated with 1 mg/mL of bLf (2.8x10<sup>5</sup> vs 2.1x10<sup>5</sup>, p=0.04) and 50% when they were pre-incubated with 10 mg/mL of bLf (2.8x10<sup>5</sup> vs 1.4x10<sup>5</sup>, p=0.04). In post-infection treatment, no changes were observed in the invasiveness of *Salmonella*. **Conclusion:** The results indicated that bLf reduces the invasiveness of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium to HEP-2 cells in the pre-infection treatment.

**Keywords:** *Salmonella*; Lactoferrin; *Salmonella* infections; Diarrhea (source: MeSH NLM).

## INTRODUCCIÓN

Las salmonellas son bacterias gram-negativas que comprenden alrededor de 2500 serotipos, muchos de los cuales son patógenos importantes de humanos y animales. Dos de las principales manifestaciones clínicas causadas por *Salmonella* son: gastroenteritis (salmonelosis) y fiebre entérica (tifoidea). La gastroenteritis es la más común de las infecciones intestinales causada por muchos serotipos. Este tipo de infección no está acompañado de una infección sistémica como en el caso de la fiebre entérica. Los serotipos más comunes asociados a la gastroenteritis son *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* (*S. typhimurium*) y *S. enteritidis* <sup>(1,2)</sup>.

*Salmonella* es adquirida por ingestión de agua y/o alimentos contaminados, sobrevive a los ácidos gástricos

del estómago hasta llegar a colonizar el epitelio del intestino. Después del contacto de la bacteria con las células hospederas, ésta transloca proteínas efectoras a través de un sistema de secreción tipo III (SST3), lo que permite la invasión a través de la membrana plasmática, lo que resulta finalmente en la inducción de la respuesta inflamatoria intestinal <sup>(2)</sup>.

Las infecciones gastrointestinales son una de las principales causas de enfermedad y muerte en niños; estas infecciones pueden causar más de 3,3 (15%) millones de muertes por año en niños menores de 5 años de edad en países en vías de desarrollo <sup>(3)</sup>. Por otro lado, la lactancia materna se ha identificado como la intervención más efectiva para proteger a los niños menores de 5 años de edad contra las diarreas <sup>(4)</sup>. El efecto protector de la leche materna parece ser un evento complejo y es atribuido al

contenido de inmunoglobulinas A (IgA) y compuestos no inmunológicos como la lisosima y lactoferrina <sup>(5)</sup>. La lactoferrina (Lf), una glicoproteína de 80 kDa, es la segunda proteína más abundante de la leche materna. Se encuentra en una concentración de 10 mg/mL y 1 mg/mL en el calostro humano y en la leche madura, respectivamente <sup>(4)</sup>. Esta proteína es multifuncional y es considerada un componente esencial de la respuesta inmune innata. Entre sus funciones destacan sus actividades como microbioestático, microbicida de amplio espectro, antitumoral y antioxidante. Además, por el hecho de contener hierro se ha postulado como una proteína con valor nutricional <sup>(6)</sup>.

Se han propuesto múltiples mecanismos para explicar el efecto de la lactoferrina y su interacción con enteropatógenos. Se conoce que la lactoferrina no sólo secuestra hierro, el cual es esencial para el crecimiento bacteriano (capacidad bacteriostática), sino que también puede adherirse a porinas y al lípido A del lipopolisacárido bacteriano (LPS) presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, cambiando su rigidez y consecuentemente desestabilizándolas <sup>(7)</sup>. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado el efecto protector de la lactoferrina humana (Lfh) así como la lactoferrina bovina (Lfb) contra diferentes infecciones por enteropatógenos, las cuales incluyen: *Shigella flexneri*, *Salmonella ser. Typhimurium*, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) <sup>(8)</sup>.

En este estudio se evaluó el efecto de la lactoferrina bovina (Lfb) en la invasión de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 a células HEp-2.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Bacteria y condiciones de cultivo

En este estudio fueron usadas *Salmonella enterica ser. Typhimurium* SL1344 silvestre (NCTC 13347) y *Salmonella enterica ser. Typhimurium* SL1344  $\Delta$ hilA::Kanr. Esta última cepa fue usada como control negativo de los ensayos de invasión ya que está afectada en su capacidad de translocar proteínas efectoras a través del SST3 y por consiguiente en su capacidad de invasión.

Las bacterias fueron cultivadas en caldo Luria Bertani (LB) a 37°C.

### Cultivo de células y ensayo de invasión

En los ensayos se usó la línea celular HEp-2 (human larynx carcinoma). Las células HEp-2 fueron cultivadas en placas de 24 pozos en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero

bobino fetal (SBF) durante 24 h a 37°C en un atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (hasta obtener una confluencia de 70%).

El ensayo de invasión se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Lee et al. <sup>(9)</sup>. Las células previamente cultivadas en las placas de 24 pozos fueron infectadas con 10<sup>6</sup> UFC de *Salmonella* durante un periodo de 1,5 h a 37°C y bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para determinar el papel protector de la Lfb frente a la invasión de *Salmonella* se probaron diferentes condiciones de tratamiento:

Se usaron dos concentraciones diferentes de Lfb (Tatua Nutritional, Nueva Zelanda): 1mg/mL (0,0125 mmol/L) Lfb y 10 mg/mL (0,125 mmol/L) Lfb, las cuales corresponden a la concentración de Lf presente en el calostro y leche madura humana, respectivamente.

La Lfb tiene un efecto bacteriostático por su afinidad a ligarse con los iones de hierro; por este motivo se suplementó el medio de resuspensión bacteriana con hierro (en una relación 2:1 molar respecto a la concentración de Lfb) para demostrar que la disminución de la invasión no se debe al efecto bacteriostático de la Lfb (disminución en el crecimiento bacteriano) sino por otro mecanismo no-dependiente del hierro.

Así mismo se analizaron dos tratamientos diferentes: i) Pre infección: las células HEp-2 fueron incubadas con Lfb (0, 1 y 10 mg/mL en DMEM) 1h previa a la infección bacteriana, y ii) Post infección: las células HEp-2 fueron infectadas con *Salmonella* durante 15 minutos, luego las células fueron tratadas con Lfb (0, 2 y 20 mg/mL en DMEM).

Luego de la infección, la monocapa de células infectadas fue lavada 5 veces con PBS 1X para remover las bacterias no adheridas. Adicionalmente, se realizaron 2 tratamientos con gentamicina (1 ml de DMEM - HEPES + 100 µg/mL de gentamicina) 1 hora/37°C, seguido de 1 ml de DMEM - HEPES + 10 µg/mL de gentamicina 2 horas/37°C, con la finalidad de matar la totalidad de las bacterias extracelulares.

### Cuantificación de la invasión

Luego del periodo de infección se adicionó 100 µl de Triton X-100 1% (v/v) y se dejó incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, se removió el contenido de cada pozo (despegando y lisando las células para liberar las bacterias). Luego, se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) de cada pocillo y se sembró 50 µl de cada dilución en placas de agar Mc Conckey.

Todos los ensayos se realizarán por duplicado, los mismos que se repitieron 3 veces.

## Análisis Estadístico

La comparación entre los tratamientos fueron analizados por la prueba de Mann-Whitney, el nivel de significancia fue definido como  $p < 0,05$ . El programa SPSS versión 19.0 fue usado para los análisis.

## RESULTADOS

### Tratamiento pre-infección

Las células HEP-2 pretratadas con Lfb mostraron una disminución significativa en la invasión en comparación con el control (Figura 1). La capacidad invasiva de *Salmonella* disminuyó 50% con Lfb a 10 mg/mL ( $2,8 \times 10^5$  UFC/mL vs.  $1,4 \times 10^5$  UFC/ml, U de Mann-Whitney,  $p=0,04$ ) y 23% con Lfb a 1 mg/mL, en comparación con el control ( $2,8 \times 10^5$  UFC/mL vs.  $2,1 \times 10^5$  UFC/mL, U de Mann-Whitney,  $p=0,04$ ).

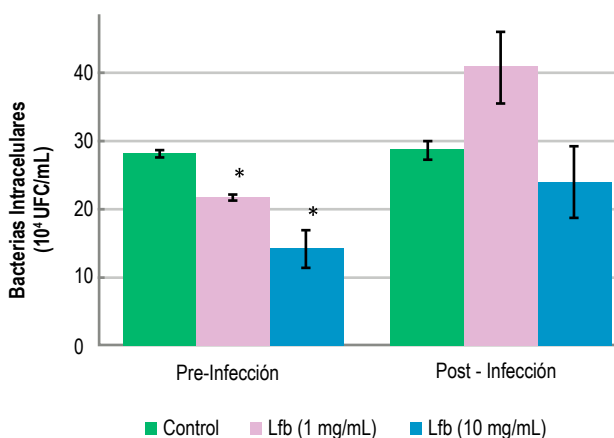
### Tratamiento post-infección

En el tratamiento de post-infección, no hubo diferencia significativa, lo cual indica que Lfb no pudo proteger a las células HEP-2 de la infección. La invasión de *Salmonella* en la cepa silvestre sin tratamiento fue  $2,8 \times 10^5$  UFC/mL, mientras que en el tratamiento con Lfb a 1 mg/mL fue  $4,0 \times 10^5$  UFC/mL (rango promedio = 7; U de Mann-Whitney,  $p=0,117$ ) y  $2,3 \times 10^5$  UFC/mL (rango promedio = 5; U de Mann-Whitney,  $p=0,602$ ) con Lfb a 10 mg/mL.

La cepa de control negativo (SL1344  $\Delta$ hilA::Kan<sup>r</sup>) no mostró invasión de células HEP-2 en los dos tratamientos evaluados.

## DISCUSIÓN

La capacidad de la leche humana, así como sus fracciones de proteínas, para inhibir la adhesión y/o invasión de patógenos entéricos ha sido evaluado en



**Figura 1.** Efecto de Lfb en la invasión de células HEP-2 en los ensayos de pre-infección y postinfección con *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. Media  $\pm$  SEM de bacterias intracelulares contabilizadas por UFC.

diversos estudios desarrollados *in vivo* e *in vitro* (10-12). Se ha evidenciado que Lf puede contribuir a la defensa contra la invasión de bacterias intracelulares facultativas mediante la unión de glicoaminoglicanos de la membrana celular e invasinas bacterianas, previniendo de esta manera la adhesión a las células (13).

Se ha observado que Lf disminuye la virulencia de algunos de los principales patógenos al disminuir su habilidad de adherirse o invadir células mamíferas, y al unirse o degradar proteínas de virulencia específicas (8). En cultivos celulares, se ha mostrado que Lfb interactúa con las proteínas de superficie de *Salmonella typhimurium* y reduce su habilidad de adhesión a las células huésped (10). Mosquito *et al.* (14), demostraron el efecto protector *in vivo* de la Lfb en la infección de *Salmonella typhimurium* en ratones. Los ratones que fueron infectados con *Salmonella* y recibieron tratamiento con Lfb tuvieron menos mortalidad y signos clínicos típicos de la infección (piloerección, encorvamiento y reducción en el movimiento) así como también disminución del daño en la integridad del epitelio intestinal.

Se ha demostrado que Lfb puede proteger contra la infección de bacterias gram-negativas debido a su actividad bacteriostática y bactericida. La acción bacteriostática de Lfb se debe a su capacidad de captar el hierro, lo cual limita la disponibilidad de este nutriente esencial para la bacteria y por lo tanto la inhibición del crecimiento, así como la expresión de algunos factores de virulencia (15). En el presente trabajo, empleamos el medio saturado con hierro y así confirmamos que el efecto inhibitorio de Lfb no se debió a un efecto bacteriostático (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos en el tratamiento pre-infección sugieren que la inhibición de la invasión observada se debe a la protección celular, posiblemente por la unión de Lfb a la superficie bacteriana; y de esta manera se bloquearía la adherencia y la invasión de las células. Por esta razón, postulamos la hipótesis que Lfb podría ser su usada como un tratamiento profiláctico para la infección por *Salmonella*. Este hallazgo podría estar relacionado con el estudio de la infección de *S. typhimurium* reportado por Naidu *et al.* (16), donde demostraron la interacción de Lf y LPS. Lf bloquea proteínas de sistema de secreción tipo 3 (SST3) que son las responsables de la polimerización de la actina de las células epiteliales como resultado de la infección de EPEC y *S. flexneri* (11,12,17). En este contexto, el efecto de Lfb en la invasión de *Salmonella* a células HEP-2 podría ser debido a un mecanismo similar como en *Shigella*.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el tratamiento post-infección muestran que la Lfb no pudo revertir el proceso de invasión de *Salmonella* a las células HEP-2. Nosotros suponemos, que los resultados

conseguidos en el tratamiento post-infección con Lfb a 1 mg/mL se deba a que la concentración de Lfb fue insuficiente para disminuir la invasión, lo cual se evidenció en el incremento de bacterias intracelulares obtenidas en el estudio. Presumimos que el periodo de incubación fue suficiente para que la bacteria pueda invadir la monocapa de células HEp-2; por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la administración de Lfb después de ocurrida la infección con *Salmonella*, no ayudaría a controlar y/o disminuir la invasión en ensayos *in vitro*.

En base a los resultados observados podemos concluir que Lfb reduce la invasión de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium en células HEp-2. La disminución de la invasión fue mayor en el tratamiento pre-infección con Lfb en la concentración de 10 mg/mL. Estos datos sugieren que Lfb podría actuar como un compuesto protector contra infecciones causadas por *Salmonella*.

### Agradecimientos

Las cepas de *Salmonella* usadas en este estudio fueron gentilmente donadas por el Dr. José Luis Puente (Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México).

**Fuente de financiamiento:** este estudio fue parcialmente financiado por el Fondo de apoyo a la investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia otorgado a la Dra. Theresa Ochoa.

**Conflictos de intereses:** los autores no declaran conflicto de intereses.

### BIBLIOGRAFÍA

- Ohl ME, Miller SI. [Salmonella: a model for bacterial pathogenesis](#). Annu Rev Med. 2001;52:259-74.
- Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. [Salmonellae interplay with host cells](#). Nat Rev Microbiol. 2008;6(1):53-66.
- Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. [Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis](#). Lancet Lond Engl. 2010;375(9730):1969-87.
- Ochoa TJ, Brown EL, Guion CE, Chen JZ, McMahon RJ, Cleary TG. [Effect of lactoferrin on enteroaggregative E. coli \(EAEC\)](#). Biochem Cell Biol. 2006;84(3):369-76.
- Hanson LA, Winberg J. [Breast milk and defence against infection in the newborn](#). Arch Dis Child. 1972;47(256):845-8.
- León-Sicairos N, Picos V. Lactoferrina: proteína que secuestra hierro en las mucosas. In: La lucha por el hierro patógeno versus hospedero. 1ra Edición. México: Cinvestav; 2010.
- Brandenburg K, Jürgens G, Müller M, Fukuoka S, Koch MH. [Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin](#). Biol Chem. 2001;382(8):1215-25.
- Ochoa TJ, Cleary TG. [Effect of lactoferrin on enteric pathogens](#). Biochimie. 2009;91(1):30-4.
- Lee CA, Jones BD, Falkow S. [Identification of a Salmonella typhimurium invasion locus by selection for hyperinvasive mutants](#). Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1992;89(5):1847-51.
- Bessler HC, de Oliveira IR, Giugliano LG. [Human milk glycoproteins inhibit the adherence of Salmonella typhimurium to HeLa cells](#). Microbiol Immunol. 2006;50(11):877-82.
- Gomez HF, Ochoa TJ, Herrera-Insua I, Carlin LG, Cleary TG. [Lactoferrin protects rabbits from Shigella flexneri-induced inflammatory enteritis](#). Infect Immun. 2002;70(12):7050-3.
- Ochoa TJ, Noguera-Obenza M, Ebel F, Guzman CA, Gomez HF, Cleary TG. [Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic Escherichia coli](#). Infect Immun. 2003;71(9):5149-55.
- Adlerova L, Bartoskova A, Faldyna M. [Lactoferrin: a review](#). Vet Med (Praha). 2008;53(9):457-68.
- Mosquito S, Ochoa TJ, Cok J, Cleary TG. [Effect of bovine lactoferrin in Salmonella ser. Typhimurium infection in mice](#). Biometals. 2010;23(3):515-21.
- Reyes-Reyes R, Manjarrez-Hernández H, Drago-Serrano ME. El hierro y la virulencia bacteriana. Enf Inf Microbiol. 2005;25:104-7.
- 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(2):240-5.
- Gomez HF, Ochoa TJ, Carlin LG, Cleary TG. [Human lactoferrin impairs virulence of Shigella flexneri](#). J Infect Dis. 2003;187(1):87-95.

### Correspondencia:

Liz Barreto Arce

E-mail: [liz.barreto.arce@gmail.com](mailto:liz.barreto.arce@gmail.com)