



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

**Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera sobre biofilms de
Salmonella Typhimurium en células Caco-2**

T E S I S

Que presenta

Med. Laura Esmeralda Quintero Martínez

Para obtener el Grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dra. Nidia Maribel León Sicairos

Dr. Vicente Adrián Canizalez Román

Culiacán, Sinaloa, México

Octubre, 2019

PRESENTACIÓN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación Aplicado a la Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa, como parte de la Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, bajo la dirección de la Dra. Nidia Maribel León Sicaños y el Dr. Vicente Adrián Canizalez Román. Este proyecto también contó con la asesoría del Dr. Héctor Manuel Flores Villaseñor y el Dr. Jorge Adalberto Velázquez Román.

El presente proyecto recibió financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del fondo Ciencia Básica Convocatoria 2014 (No. CB-2014-236546) y financiamiento parcial por parte de la Universidad Autónoma de Sinaloa a través del Programa de Fortalecimiento de Proyectos de Investigación PROFAPI-UAS (2014/105, 2015/141).

Para realizar sus estudios de Maestría Laura Esmeralda Quintero Martínez recibió una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. Becario 892504).



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina
ACTA DE REVISION DE TESIS



En la ciudad de Culiacan,Sinaloa siendo las 10 hrs del día 28 del mes de octubre del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Cuerpo Académico de la Maestría en Biomedicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para examinar la tesis titulada:

Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera sobre biofilms de Salmonella Typhimurium en células Caco-2.

Presentada por el alumno:

Quintero

Martínez

Laura Esmeralda

Nombre Paterno

Apellido Materno

Nombre (s)

Con registro:

8	9	2	5	0	4
---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

Maestría en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por la disposiciones reglamentarias vigentes.

COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis

Dra. Nidia Maribel León Sicairos

Dr. Vicente Adrian Canizalez Román

Revisores de tesis

Dr. Jorge Adalberto Velázquez Román

Dr. Hector Manuel Flores Villaseñor

MC. Uriel Alberto Angulo Zamudio



Universidad Autónoma de Sinaloa Facultad de Medicina



CARTA DE CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacan, Sinaloa el día 28 del mes octubre del año 2019, el que suscribe **Laura Esmeralda Quintero Martínez** alumno del Programa de **Maestría en Biomedicina Molecular** con número de registro 0908563-7 adscrito a la Facultad de Medicina, manifiesta que realizó su trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Nidia Maribel León Sicairos** y del **Dr. Vicente Adrian Canizalez Román** y cede los derechos del trabajo titulado **Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera sobre biofilms de *Salmonella Typhimurium* en células Caco-2** a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa y al Director de Tesis para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico laura_esmeraldaq1@hotmail.com/nidialeon@uas.edu.mx . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M.C. Laura Esmeralda Quintero Martínez

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría agradecer a mis padres, sin ellos no hubiera sido posible haber estudiado y terminado un posgrado el día de hoy. Gracias por su fe en mí y por su apoyo en todo lo que he necesitado. También agradezco a Dios y a mis perritos Kelly, Nena y Chiquita, que han sido mis acompañantes fieles, mi motivo para salir adelante y un apoyo emocional en todo momento.

Gracias a la Universidad Autónoma de Sinaloa, que me abrió sus puertas y me permitió adquirir muchos conocimientos tanto de mis profesores y de mis compañeros, y que hoy en día me permite concluir un posgrado.

Gracias a mis directores de tesis la Dra. Nidia Maribel León Sicaños y Dr. Adrián Canizalez Román por compartir sus conocimientos conmigo, por tenerme mucha paciencia y siempre creer en mí, guiarme y aconsejarme para poder concluir la maestría.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que me otorgo una beca para que yo pudiera dedicarme a mis estudios de posgrado.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Izamar Guadalupe Arredondo y Diana Aurora Ramírez, por su amistad que valoro como un tesoro y por siempre apoyarme y ayudarme con mi proyecto y mis experimentos, además de permitirme nutrirme de sus conocimientos todos los días. También agradezco a mi compañero de laboratorio y estudiante de doctorado Uriel Angulo Zamudio, que siempre me orientó con sus conocimientos y me asesoró en todo lo que necesite para poder llevar a cabo todo mi protocolo y experimentos.

INDICE GENERAL

	Pág.
INDICE DE FIGURAS	v
I RESUMEN	1
ABSTRACT	2
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISIÓN DE LITERATURA	6
<i>A Salmonella</i>	6
1 Características y clasificación	6
2 Epidemiología de salmonelosis	10
3 Resistencia antimicrobiana	10
a Resistencia en cepas aisladas de brotes	10
b Mecanismos de resistencia a antimicrobianos	11
c Resistencia antimicrobiana en <i>Salmonella</i>	15
4 Biofilms de <i>Salmonella</i>	16
B LACTOFERRINA	21
1 Características	21
2 Estructura	21
3 Péptidos derivados	22
4 Actividad antimicrobiana	24
a Mecanismo de acción	24
b Antecedentes previos	26
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29

V	JUSTIFICACIÓN	30
VI	HIPOTESIS	31
VII	OBJETIVOS	32
	A OBJETIVO GENERAL	32
	B OBJETIVO ESPECIFICO	32
VIII	MATERIALES Y MÉTODOS	33
	A MATERIALES	33
	1 Lactoferrina bovina y péptido sintético derivado	33
	2 Cultivo de <i>Salmonella</i> Typhimurium	33
	3 Cultivo de células Caco-2	33
	a Conteo y determinación de viabilidad celular	34
	B METODOLOGÍA	35
	1 Cinética de inhibición de crecimiento de <i>Salmonella</i>	35
	2 Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en la formación de biofilms de <i>S.</i> Typhimurium en células Caco-2	35
	3 Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en biofilms maduros de <i>S.</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2	36
	a Estandarización de biofilms maduros en células Caco-2	37
	b Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en superficie	37
	c Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2	38
	d Visualización del efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en biofilms	39

maduros en células Caco-2 mediante microscopía	
4 Determinación de sinergismo entre Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera con antibiótico en biofilms maduros de <i>S. Typhimurium</i> establecidos en células Caco-2	40
a Prueba de susceptibilidad antimicrobiana (Método Kirby-Bauer)	40
b Evaluación de la resistencia a cloranfenicol por <i>S. Typhimurium</i> mediante el método de macrodilución	41
c Prueba de resistencia de biofilms maduros de <i>S. Typhimurium</i> a cloranfenicol	41
d Ensayo de sinergismo entre Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera con cloranfenicol	42
e Visualización del efecto sinérgico entre Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera con cloranfenicol	43
5 Análisis estadístico	44
IX RESULTADOS	45
A EFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA EN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS DE <i>Salmonella</i> Typhimurium EN ESTADO PLANCTÓNICO	45
1 Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera previenen la formación de biofilms de <i>Salmonella</i> Typhimurium en estado planctónico, en un efecto concentración dependiente	45
2 Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera previenen la formación de biofilms de <i>Salmonella</i> Typhimurium en células Caco-2	47
B EFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA EN BIOFILMS MADUROS DE <i>S. Typhimurium</i> ESTABLECIDOS EN CÉLULAS CACO-2	50

1	Estandarización de biofilms de <i>Salmonella</i> Typhimurium maduros en células Caco-2	51
2	Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera destruyen biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en superficie	51
3	Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera destruyen biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2	54
C	EFFECTO SINÉRGICO DE LACTOFERINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA EN COMBINACIÓN CON ANTIBIOTICOS CONTRA BIOFILMS DE <i>Salmonella</i> Typhimurium	58
1	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>Salmonella</i> Typhimurium	58
2	<i>Salmonella</i> Typhimurium presenta resistencia al antibiótico cloranfenicol	60
3	Los biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2 son resistentes al antibiótico cloranfenicol	62
4	Lactoferrina bovina y cloranfenicol presentan acción sinérgica en biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2	64
5	Lactoferrina quimera y cloranfenicol presentan acción sinérgica en biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2	67
X	DISCUSIÓN	70
XI	CONCLUSIONES	76
XII	BIBLIOGRAFIA	77
	Abreviaturas	84

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág
1	Etapas de formación de un biofilm	18
2	Estructura de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera	24
3	Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera inhiben el crecimiento en <i>Salmonella</i> Typhimurium en estado planctónico, en un efecto concentración dependiente.	46
4	Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera previenen la formación de biofilms de <i>Salmonella</i> Typhimurium sobre células Caco-2 durante 4 horas de tratamiento.	48
5	Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera previenen la formación de biofilms de <i>Salmonella</i> Typhimurium sobre células Caco-2 durante 6 horas de tratamiento.	49
6	Establecimiento de biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium en células Caco-2.	51
7	Lactoferrina quimera destruye biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en superficie, durante 4 y 6 h de tratamiento.	52
8	Lactoferrina bovina destruye biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en superficie, después de 8 y 12 h de tratamiento.	53
9	Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera destruyen biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2.	55
10	Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera disgregan biofilms maduros de	57

	<i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2.	
11	<i>Salmonella</i> Typhimurium es resistente a cloranfenicol y otros antibióticos.	59
12	<i>Salmonella</i> Typhimurium en estado planctónico presenta resistencia a cloranfenicol.	61
13	Biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2 son resistentes a cloranfenicol.	63
14	Lactoferrina bovina actúa en sinergismo con cloranfenicol contra biofilms de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2.	65
15	Lactoferrina bovina presenta efecto sinérgico en combinación con cloranfenicol en biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2.	66
16	Lactoferrina quimera y cloranfenicol presentan efecto sinérgico contra biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2.	68
17	Lactoferrina quimera presenta efecto sinérgico en combinación con cloranfenicol en biofilms maduros de <i>Salmonella</i> Typhimurium establecidos en células Caco-2.	69

I RESUMEN

La bacteria *Salmonella* es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas. Si bien la mayoría de los casos de salmonelosis son leves, algunas veces la enfermedad puede ser mortal. La gravedad de la enfermedad depende de factores propios del huésped y del serotipo de *Salmonella*. La capacidad de *Salmonella* para formar complejas comunidades asociadas a superficies, llamadas biofilms, contribuye a su persistencia en el ambiente, los alimentos y el hospedero, además de aumentar su resistencia a las diversas estrategias de control y eliminación. Esto representa un problema grave a nivel mundial, con grandes pérdidas económicas, pero sobre todo costos a la salud humana. El objetivo de este estudio fue determinar si Lactoferrina bovina (bLF) y Lactoferrina quimera (LFquimera), previenen ó destruyen biofilms de *Salmonella* Typhimurium establecidos en células Caco-2. Adicionalmente, también se propuso establecer si bLF y LFquimera presentan acción sinérgica con cloranfenicol contra el aislado clínico de *S. Typhimurium* multi-fármaco-resistente. Primeramente, para determinar si bLF y LFquimera previenen la adherencia y formación de biofilms de *S. Typhimurium* sobre células Caco-2, las células y las bacterias se incubaron al mismo tiempo con diferentes concentraciones de bLF y LFquimera y al finalizar se cuantificó la biomasa del biofilm y el crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría y por conteo de UFC/mL. Posteriormente, se determinó el efecto de bLF y LFquimera sobre biofilms maduros de *S. Typhimurium* establecidos en células Caco-2, al tratar a los biofilms establecidos en las células con bLF y LFquimera, al finalizar los tratamientos se cuantificó la biomasa del biofilm y el crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría y por conteo de UFC/mL. También fue posible visualizar el efecto de la bLF y LFquimera mediante tinción con Giemsa y microscopia de campo claro. Finalmente, para evaluar el sinergismo, se realizó el ensayo de resistencia a antibióticos al aislado clínico de *S. Typhimurium* mediante el método de Kirby-Bauer, y una vez determinada la resistencia el efecto sinérgico de bLF y cloranfenicol, ó de LFquimera mas cloranfenicol se determinó en las muestras tratadas mediante conteo de UFC/mL. En los resultados se observó que bLF y LFquimera inhibieron la adherencia y formación de biofilms de *S. Typhimurium* en células Caco-2. Asimismo, tanto bLF como LFquimera destruyeron biofilms maduros establecidos en células Caco-2. En los ensayos de sinergismo, solo LFquimera presentó sinergismo en combinación con cloranfenicol en biofilms de *S. Typhimurium* establecidos en células Caco-2. Los resultados de este estudio muestran potencial de bLF y LFquimera como nuevas alternativas para el combate de biofilms de *S. Typhimurium* y probablemente de otras bacterias.

ABSTRACT

The bacterium *Salmonella* is one of the four main causes of diarrheal diseases. While most cases of salmonellosis are mild, sometimes the disease can be fatal. The ability of *Salmonella* to forming elaborated communities associated with surfaces, called biofilms; contributes to its persistence in the environment, food and the host, and for that the ability to increasing its resistance to several control and elimination strategies. This represents a serious problem worldwide, with great economic losses, but above all; costs to human health. The aim of this study was to determine if bovine lactoferrin (bLF) and Lactoferrin chimera (LFchimera); prevent adherence and formation, or destroy *S. Typhimurium* biofilms established in Caco-2 cells. Additionally, the synergistic effect between bLF and LFchimera in combination with chloramphenicol against multi-drug-resistant *S. Typhimurium* was also investigated. Firstly, to determine if bLF and LFchimera prevent adherence or biofilm formation by *S. Typhimurium* on Caco-2 cells, bacteria and cells were incubated with bLF and LFchimera, then biofilms biomass or growth of biofilms were quantified by spectrophotometry or CFU/mL counts. Subsequently, to determine if bLF and LFchimera destroy *S. Typhimurium* mature biofilms established on Caco-2, once biofilms were formed they were treated with bLF and LF chimera, biofilms biomass or growth of biofilms were quantified by spectrophotometry or CFU/mL counts. Additionally, the effects of bLF and LFchimera on *S. Typhimurium* biofilms established on Caco-2 cells also was visualized by using Giemsa staining and light microscopy. Finally, to determine if bLF and LFchimera have synergistic effect in combination with chloramphenicol against *S. Typhimurium* multidrug-resistant, the Kirby-Bauer method was performed to carry out the interaction between bLF and LFchimera, alone or in combination with chloramphenicol, in mature *S. Typhimurium* biofilms established on Caco-2. The synergism was established by using the CFU/mL count and the FICI interpretation. In the Results, bLF and LFchimera prevents and avoid *S. Typhimurium* adherence and biofilm formation on Caco-2 cells. Likewise, bLF and LFchimera destroy mature biofilms established on Caco-2cell. Finally, LFchimera showed synergism in combination with chloramphenicol against *S. Typhimurium* biofilms established on Caco-2 cells. The results of this study show that bLF and LFchimera have potential to eliminate *S. Typhimurium* biofilms, and probably biofilms from other bacteria.

II INTRODUCCIÓN

Salmonella es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, habitando principalmente el intestino humano y de animales, excretándose al ambiente (Sha et al. 2013). Dentro de este género se encuentran dos especies *S. bongori* y *S. entérica* (McQuiston et al. 2008; Ewing 1972). En particular, la especie *Salmonella enterica* incluye numerosas cepas patógenas. Esta bacteria es la causa más frecuente de infecciones transmitidas por los alimentos (ETAs), con incidencia de 1,3 billones de casos anuales en el mundo y alrededor de 3 millones de muertes (Chen et al. 2012; Besser 2018). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, es uno de los serovares más comunes asociados a salmonelosis clínica en humanos, representando al menos el 15% de las infecciones, las cuales, han mostrado disminución en la susceptibilidad a los antibióticos tradicionales (Okanda et al. 2018; Asai et al. 2010). La creciente resistencia a antibióticos convencionales por parte del género *Salmonella* representa un problema de salud pública mundial, debido a la amplia gama de hospederos del patógeno y su potencial para diseminar los determinantes de resistencia a los antibióticos a otras bacterias (Klemm et al. 2018; Biendo et al. 2003; Delgado Ronda et al. 2006). En México, en el año 2017 se reportaron 92,013 casos de salmonelosis producidos por *Salmonella enteritidis*, y estos fueron confirmados por el Sistema Nacional de Epidemiología (SINAVE), sin embargo; se especula que el número de casos podría ser mayor.

Además de que se ha reportado que *Salmonella* y sus serotipos patógenos son resistentes a los antibióticos, estos tienen la capacidad de formar biofilms en superficies, suelos, plantas de consumo humano y en animales domésticos, lo que a su vez los hacen más resistentes a su eliminación (Gaertner et al. 2011; Mangalappalli-Illathu and Korber 2006; Ramesh et al. 2002). La búsqueda de alternativas para combatir esta creciente problemática, ha conducido al estudio de Lactoferrina

bovina (bLF) y péptidos derivados, por su efecto antimicrobiano y biofilmicida (Brock 2012; Embleton et al. 2013; Farnaud and Evans 2003).

Lactoferrina es una proteína miembro de la familia de las transferrinas por su capacidad de unión al hierro y con carga positiva. Esta es producida principalmente por células epiteliales y neutrófilo, encontrándose en fluidos como la leche, lágrimas, semen, saliva, secreciones bronquiales, entre otros. Esta proteína es parte del sistema de defensa debido a que presenta actividad antimicrobiana, antiviral, antitumoral, inmunomodulatoria, entre otras (Vogel 2012; Brock 2002; Baker et al. 1991).

Anteriormente, se ha demostrado que LF inhibe el crecimiento, tanto de bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, entre ellas, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis* (Orsi 2004; Arnold et al. 1982; Flores-Villasenor et al. 2010) También ha mostrado inhibir la adhesión a bacterias como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e incluso *S. Typhimurium* en cultivos celulares, lo cual favorece su actividad anti-biofilm (Vogel 2012; Singh 2004; Sheffield et al. 2012) Además, LF y sus péptidos derivados, han presentado efecto potente contra bacterias fármacoresistentes como EHEC O157: H7, EPEC y *S. aureus* resistente a la meticilina (Flores-Villasenor et al. 2012; Redwan et al. 2016) e incluso, aumentan el efecto de antibióticos al actuar en sinergismo con ellos en microorganismos que han desarrollado resistencia a ellos (Tanaka et al. 2000; Flores-Villasenor et al. 2010; Leon-Sicairos et al. 2006; Acosta-Smith et al. 2017).

A partir de LF, se derivan péptidos como resultado de su digestión con enzimas gástricas, como Lactoferricina 17-30 (LFcina17-30) (Tomita et al. 1991), o bien se pueden obtener en el laboratorio como en el caso de la Lactoferrampina 265-284 (LFampina265-244) (van der Kraan et al.

2004; van der Kraan et al. 2005), tanto péptidos obtenidos de manera natural durante la ingestión de LF, como aquellos obtenidos en el laboratorio, e inclusive los que son de origen sintético, todos han presentado potente actividad biológica más efectiva que la bLF nativa (Orsi 2004; Drago-Serrano et al. 2017; Flores-Villaseñor et al. 2010; Flores-Villasenor et al. 2010; Lizzi et al. 2009b).

Mediante síntesis de péptidos de bLF, en el cual se llevó a cabo la unión de los LFcina17-30 y LFampina265-284 por medio del aminoácido lisina, dio como resultado un nuevo péptido conocido como LFquimera. LFquimera adopta una conformación espacial similar a la bLF y presenta una actividad antimicrobiana más potente que sus péptidos constitutivos, al actuar inclusive en altas concentraciones de sal (Bolscher 2007; León-Sicairos 2007; Leon-Sicairos et al. 2009). Por todo lo anterior, el propósito de este estudio fue analizar el efecto de bLF y LFquimera en la formación de biofilms de *S. Typhimurium* multi-fármaco-resistente, así como en biofilms maduros establecidos en células intestinales Caco-2. Adicionalmente, se analizó el efecto sinérgico de bLF y LFquimera en combinación con cloranfenicol, un fármaco al cual *S. Typhimurium* presenta resistencia. Los resultados de este estudio proporcionan una alternativa para combatir la creciente resistencia a los antibióticos convencionales, con proteínas como bLF, perteneciente al sistema inmune, y péptidos sintéticos derivados con incluso mayor actividad antimicrobiana, como LFquimera, los cuales, debido a su mecanismo de acción, dificultan el desarrollo de resistencia por parte de las bacterias, facilitando a su vez, el acceso a los antibióticos.

III REVISION DE LITERATURA

A *Salmonella*

1 Características y clasificación

Salmonella spp. es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo su hábitat principalmente el intestino del hombre y de animales, excretándose por ello al medio ambiente (Besser 2018; Chen et al. 2012).

El género *Salmonella* forma parte de la división Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gamma-proteobacteria, orden Enterobacteriales, familia Enterobacteriaceae. El género abarca 2 especies diferentes: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *S. bongori* es una especie considerada como no patógena para el hombre, aislándose fundamentalmente de animales de sangre fría, especialmente reptiles, aunque algunos casos de enfermedad humana han sido reportados (Chen et al. 2012; McQuiston et al. 2008).

Sin embargo, *Salmonella enterica*, incluye numerosas cepas patógenas tanto para el hombre como para diferentes especies de reptiles aves y mamíferos. La especie *S. enterica* puede subdividirse en 6 subespecies diferentes: subespecie enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI). La mayoría de las subespecies se aíslan fundamentalmente de reptiles y por tanto se asocian con muy baja frecuencia a infecciones en el hombre (McQuiston et al. 2008; Ewing 1972).

Así que, *S. enterica* subespecie entérica, se aísla fundamentalmente de mamíferos y aves, alcanzando la cadena alimenticia e infecta accidentalmente al hombre. Se estima que el 99% de los casos de salmonelosis humana están causados por cepas de la subespecie I (Ewing 1972).

S. enterica subespecie entérica puede clasificarse en 1547 serovariedades ó serotipos diferentes. Las serovariedades se distinguen por la reacción con antisueros específicos frente a dos antígenos de la superficie bacteriana altamente variables: el antígeno O que refleja la variación en las porciones externas del lipopolisacárido de superficie y el antígeno H el cual refleja la variabilidad en la flagelina, proteína constituyente del flagelo bacteriano, con 46 y 115 formas antigénicas diferentes respectivamente (Kaura et al. 1982; Branchu et al. 2018). La mayoría de las cepas de *Salmonella* poseen dos genes que codifican para dos tipos distintos de flagelina, variantes del antígeno H denominadas H1 y H2. De esa manera, cada uno de los serotipos (serovares ó serovariedades) es una combinación única de los antígenos O, H1 y H2 (Kaura et al. 1982; Branchu et al. 2018). La mayoría de las serovariedades han conservado el nombre que se le daba cuando era considerada una especie. Por ejemplo, el antiguo nombre *S. enteritidis*, ahora se denomina *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, ó para simplificar, *S. enteritidis* (Le Minor 1988; Naiou and Satyavathi 1974; Kaura et al. 1982).

2 Epidemiología de salmonelosis

La salmonelosis es una de las infecciones transmitidas por alimentos más frecuentes en todo el mundo, habiéndose reportado una incidencia de 1,3 billones de casos por año en todo el mundo, con tres millones de muertes. Considerando el conjunto de los patógenos asociados a enfermedad transmitida por alimentos (ETA), *Salmonella* es el agente responsable del mayor número de muertes (Chen et al. 2012; Besser 2018).

Las infecciones por *Salmonella enterica* pueden conducir a patologías intestinales crónicas como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa crónica, además de otras patologías como la

artritis reactiva. A pesar de que la mayoría de los serotipos de *S. enterica* pueden causar enfermedad en el hombre, la salmonelosis es generalmente causada por unos pocos serotipos que predominan ampliamente. Los principales agentes etiológicos corresponden a *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella enteritidis*. Se estima que más del 70% de las infecciones humanas están causadas por 12 serovariedades prevalentes. La historia epidemiológica de las infecciones por *Salmonella* muestra que diferentes serovariedades prevalecen en diferentes momentos del tiempo (Branchu et al. 2018; McQuiston et al. 2008; Kaura et al. 1982).

El serovar aislado con mayor frecuencia de infecciones humanas en todo el mundo fue durante muchos años *Salmonella* Typhimurium aunque desde los años 90 el serovar Enteritidis ha superado en número a *S. Typhimurium* en muchas regiones (Branchu et al. 2018; Kaura et al. 1982; Smith-Palmer et al. 2003). En Uruguay, *Salmonella* es el principal agente causal de ETA, siendo responsable de más del 30% del total de los brotes registrados por el Ministerio de Salud Pública entre el 2000 y 2009 (Betancor et al. 2004; Betancor et al. 2010). En Uruguay, hasta 1994 prevalecía ampliamente el serotipo Typhimurium entre los aislamientos obtenidos de casos de infección humana. En el año 1995 se registró un importante brote epidémico causado por *S. enteritidis*, vinculado al consumo de sándwiches elaborados por una confitería de Montevideo (Betancor et al. 2004). A partir de ese momento, comenzó a registrarse un incremento importante en el número de brotes epidémicos de ETA asociados fundamentalmente al consumo de productos avícolas contaminados, en los que *S. enteritidis* se constató como el agente causal (Betancor et al. 2005). A partir de 1997 y hasta 2004, este serotipo prevaleció en nuestro país como agente causal de salmonelosis humana. A partir del año 2004, aumenta el número de aislamientos correspondientes a otros serotipos y vuelven a predominar las cepas del serovar Typhimurium a la vez que se detectan varios casos causados por serotipos variados, así como pequeños brotes asociados a serotipos como

S. Montevideo (datos del MSP y Centro Nacional de *Salmonella* CNS). Durante el año 2009 y 2010, se registra un incremento en los aislamientos pertenecientes a *S. enteritidis*, superando nuevamente en número a los de *S. Typhimurium* (Besser 2018). Una variedad mayor de serotipos es aislada de animales y alimentos, habiendo algunos como *S. Derby*, que parecen ser muy frecuentes en las fuentes no humanas de aislamiento y sin embargo no son detectados como causa de enfermedad humana (Betancor et al. 2010).

En México, se sabe que las infecciones a causa de *Salmonella* han permanecido desde el siglo XV. Se ha documentado durante la llegada de los españoles la población mexicana que era de 15-30 millones, a finales del siglo XVI la población era de aproximadamente 2 millones. Entre las causas de esta mortalidad se han citado las epidemias conocidas (viruela, sarampión, etc.), las guerras y la hambruna, pero más recientemente se ha atribuido principalmente a una nueva enfermedad, una fiebre hemorrágica no conocida antes en aquella área del mundo (Acuna Soto et al. 2006). A la enfermedad se le llamó *cocoliztli* (cocoliste), que significa pestilencia. Entre los síntomas se encontraban la fiebre, diarrea, dolor de abdomen, ictericia y sangrado “por todos los orificios”, y con una mortalidad muy elevada, tras un curso de pocos días. A lo largo del siglo XVI acontecieron varias epidemias y solo entre los años 1570 y 1580, algunas localidades mexicanas perdieron la mitad de la población. En 1815 se documentó el último brote de la enfermedad en México (Acuna Soto et al. 2006). Un grupo de arqueólogos y genetistas mexicanos identificaron ADN de *Salmonella* en una persona fallecida en los años 1545-1550. Aunque no se sabe si existía *Salmonella* antes de la llegada de los españoles si se sabe que ya existía en Europa. Además, se sugiere que salmonelosis puede ser uno de los candidatos de la causa de la epidemia conocida como *cocoliztli*, que acabó con más de la mitad de la población de aquella época. (Acuna Soto et al. 2006; Vagene et al. 2018)

Actualmente, en nuestro país la salmonelosis, es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes. Hasta el momento, se han identificado más de 2500 serotipos o variantes séricas de este género, siendo *Salmonella* Typhimurium el serotipo patógeno más frecuentemente aislado (www.sinave.gob.mx).

3 Resistencia antimicrobiana

Cuando una bacteria crea la resistencia al antibiótico, ésta se transmite a toda la descendencia. La resistencia antibiótica es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico (Oppegaard et al. 2001; Vargiu et al. 2016). La resistencia se produce naturalmente por selección natural a través de mutaciones producidas por azar, pero también puede inducirse artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población (Waclaw 2016). Una vez que se genera la información genética, las bacterias pueden transmitirse los nuevos genes a través de transferencia horizontal (entre individuos) por intercambio de plásmidos (ADN extracromosómico) (Waclaw 2016). Si una bacteria porta varios genes de resistencia, se le denomina multi-fármaco-resistente.(Oppegaard et al. 2001; Vargiu et al. 2016; Waclaw 2016).

a Resistencia en cepas aisladas de brotes

La resistencia a antibióticos en patógenos como *Salmonella* es un gran problema de salud pública (Bager and Helmuth 2001). Esta es una bacteria difícil de eliminar de sus hospederos reservorios, además estos reservorios comúnmente son animales que se usan como alimento. *Salmonella* es un patógeno presente de forma ubicua en la cadena alimentaria humana, asociada con brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Bager and Helmuth 2001; Mangalappalli-Illathu and Korber 2006). Las investigaciones de brotes han identificado fuentes de alimentos como

verduras, productos frescos, cereales, melones, brotes de alfalfa, pistachos, pulpa de fruta/fruta, carne molida de res y pavos, carne de pollo y cerdo, atún, coco seco/triturado y tomates como vehículos de *Salmonella*, asociados a brotes transmitidos por alimentos (Angkittrakul et al. 2005; Taban et al. 2013). La situación se ha agravado debido a que cepas resistentes a antibióticos se han implicado en la incidencia de brotes, lo que conduce a fallas en el tratamiento, mayor riesgo de infecciones del torrente sanguíneo y mayor tasa de hospitalizaciones (D et al. 2018).

Salmonella fármaco-resistente ha sido asociada a brotes en EE.UU. Por ejemplo, en el 2015, un brote ocasionado a través de pepino debido a *Salmonella* serovar, S. Poona, mostró aislados resistentes a tetracilina ó ácido nalidixico. Estas cepas resistentes a ácido nalidixico, también mostraron incrementar su resistencia a ciprofloxacino, un fármaco utilizado en infecciones por *Salmonella* en niños (Ingle et al. 2019; Klemm et al. 2018; D et al. 2018). En este mismo año, una cepa de *Salmonella* multi-fármaco-resistente causó un brote a través de productos de puerco, lo que ocasionó infecciones severas en humanos, además esta resultó ser resistente a ampicilina, estreptomicina, sulfisoxazole y tetraciclina (D et al. 2018). En el 2017 ocurrió un brote a través de papaya contaminada con *Salmonella* serovar S. Urbana. Los aislados de estos brotes, mostraron resistencia a estreptomicina y resistencia intermedia a tetraciclina (D et al. 2018; Klemm et al. 2018).

b Mecanismos de resistencia a antimicrobianos

Se han identificado más de 20,000 genes potenciales de resistencia a los antibióticos de casi 400 tipos diferentes se pronostican ó identifican en las secuencias disponibles del genoma bacteriano, y se espera que este número aumente con nuevos avances en el análisis de microbiomas (Peng et al. 2018).

Entre los mecanismos de resistencia a antimicrobianos se encuentra: disminución de la permeabilidad hacia el antibiótico, inactivación del antibiótico, modificación química del blanco sobre la que actúa el antibiótico, síntesis de una enzima resistente, así como enzimas que inactivan a los antibióticos (Gaynor and Mankin 2003). El mecanismo de resistencia más común a los antibióticos es su *inactivación por mecanismos enzimáticos*. Algunas enzimas inactivadoras de fármacos quizá fueron formadas para evitar el "suicidio" o muerte celular por especies productoras de antibióticos (Peng et al. 2018). Transferidos a otra especie, los genes de tales enzimas inactivadoras ocasionan resistencia a los antibióticos. Los ejemplos clásicos de enzimas con tales propiedades son las β -lactamasas, las modificadoras de aminoglucósidos y el cloranfenicol acetiltransferasa (My et al. 2011).

Las β -lactamasas hidrolizan el anillo β -lactámico de las penicilinas y las cefalosporinas, y lo transforman en el derivado inactivo ácido peniciloico. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas producen β -lactamasas (Desgrandchamps 1992). Las de las Gram-positivas son más activas contra penicilinas y en menor grado contra las cefalosporinas. Por la estructura simple de la pared bacteriana que caracteriza a las Gram-positivas, las β -lactamasas de estas bacterias son enzimas inducibles secretadas al entorno, las de las Gram-negativas son mucho más heterogéneas y pueden ser constitutivas o inducibles (Desgrandchamps 1992; Gaynor and Mankin 2003). La estructura parietal más compleja de los microorganismos Gram-negativos, con una membrana interna y otra externa, permite la síntesis de β -lactamasas dentro del citoplasma y su excreción al espacio periplásmico (Desgrandchamps 1992). Por el mecanismo mencionado, las bacterias Gram-negativas, en forma constitutiva, producen cantidades relativamente pequeñas de enzima, que impiden el acceso

de los antibióticos β -lactámicos activos, a los "blancos" presentes en la membrana, que son las Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP) (Gaynor and Mankin 2003).

Aunque la prevalencia de cepas (sobre todo patógenas) resistentes a β -lactámicos es un fenómeno que se "disparó" desde los años 50 con el uso masivo de estos antibióticos, está claro que la resistencia debía de existir previamente al uso humano de los antibióticos (Desgrandchamps 1992). La aplicación clínica a gran escala (incluyendo el abuso) de las penicilinas y cefalosporinas sólo ha permitido que veamos en acción un caso "acelerado" de evolución bacteriana, donde las cepas más aptas han sobrevivido y se han multiplicado, y en el que, merced a los procesos de intercambio genético y a la construcción "modular" (transposones) de muchos plásmidos R, las entidades genéticas responsables se han diseminado de unas especies bacterianas a otras. Se supone que en la naturaleza como en los suelos, ciertas cepas bacterianas, antes de la aparición de la quimioterapia, poseían ya mecanismos para destruir los β -lactámicos segregados por hongos con los que coexistían (Sandanyaka and Prashad 2002).

Las enzimas que modifican aminoglucósidos constituyen el mecanismo primario de resistencia adquirida a tales fármacos en microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Las tres clases principales de dichas enzimas son las acetiltransferasas, las fosfotransferasas y las adeniltransferasas. Cada una modifica al aminoglucósido por transferencia del grupo químico indicado, por ejemplo, un acetilo, un fosforilo o un adenilo a la cadena lateral específica. Al parecer, la modificación de los aminoglucósidos no inactiva el fármaco a nivel extracelular, sino que, más bien, disminuye el transporte o la modificación del medicamento durante la fase de transporte con menor unión a ribosomas (Desgrandchamps 1992).

El acceso de los antibióticos a sus "blancos" intracelulares es un factor importante para valorar la susceptibilidad de los microorganismos a ellos. Muchas bacterias Gram-negativas son "intrínsecamente" resistentes a clases amplias de antibióticos, por su complicada estructura de membrana, que no permite la penetración de los fármacos; por el contrario, los estreptococos y los enterococos son resistentes a los aminoglucosidos, por la poca permeabilidad de su pared. Los principales mecanismos primarios de disminución del acceso de los antibióticos a las bacterias son una menor permeabilidad de la membrana externa, salida activa del fármaco y "atrapamiento" del antibiótico (Desgrandchamps 1992).

La menor permeabilidad de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas es un mecanismo común de resistencia a múltiples antibióticos, dicha membrana es una bicapa de lípidos asimétrica, compuesta de lipopolisacáridos (LPS) en la "hojilla" externa, y fosfolípidos en la interna. En la bicapa están intercaladas proteínas transmembrana, como las porinas, que forman conductos llenos de agua a través de la membrana externa. Los antibióticos hidrófobos, como la tetraciclina, penetran en la bacteria por difusión a través de la bicapa lipídica, en tanto que los hidrófilos, incluidos los β -lactámicos, algunas quinolonas y los aminoglucósidos, utilizan conductos de porina para penetrar por el espacio periplásmico (Desgrandchamps 1992). Otro mecanismo de captación referente a los aminoglucósidos es la llamada vía "autopromovida" presente en *P. aeruginosa*: los aminoglucósidos desplazan los cationes divalentes que estabilizan la interacción de los lipopolisacáridos y las porinas en la hojuela externa de la membrana externa, y así permiten la penetración de los fármacos. Los cambios en la cantidad, la estructura y la función de las porinas y los LPS pueden ocasionar resistencia a β -lactámicos, tetraciclina, quinolonas y cloranfenicol, como resultados de una disminución de número de poros ó de su diámetro en los conductos de porina transmembrana (Desgrandchamps 1992; Bush 2018; Wen et al. 2018).

c Resistencia antimicrobiana en *Salmonella*

La resistencia antimicrobiana en *Salmonella* es dependiente de la adquisición de genes de resistencia del ambiente (Bager and Helmuth 2001). Esta bacteria no es naturalmente transformable, por lo que la transferencia de genes recae en el contacto célula a célula con otra célula portadora de elementos genéticos conjugativos con genes de resistencia (Peng et al. 2018; Bythwood et al. 2019). Existe una diversidad de genes de resistencia asociados a los integrones en este ambiente, incluidas las resistencias a los b-lactámicos, fenicoles, sulfonamidas, aminoglucósidos y amonio cuaternario (Bythwood et al. 2019).

Anteriormente, se descubrió la utilidad del cloranfenicol para el tratamiento de enfermedades por *Salmonella*. Este antibiótico interfiere con la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosomal 50S procariota, sin embargo, tiene inconvenientes de alta tasa de recaída (Arcangioli et al. 2000). La ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol también se usan como antibióticos alternativos (Gallardo et al. 1999). En el caso de la ampicilina, este inhibe enzimas necesarias para la síntesis de peptidoglicanos y activa enzimas autolíticas asociadas a la membrana (Desgrandchamps 1992). Mientras que, trimetoprim y sulfametoxazol inhiben etapas en el metabolismo del folato y previenen la síntesis de ADN bacteriano (Harish and Menezes 2015).

Recientemente, se encontró resistencia al cloranfenicol, mediada por plásmidos (Arcangioli et al. 2000). Las cepas aisladas de brotes resistentes a este antibiótico mostraron también resistencia a estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclinas, codificadas por un plásmido del grupo de incompatibilidad H1, ahora denominado HI1 (Harish and Menezes 2015). El plásmido codificaba cloranfenicol acetil transferasa, además, posteriormente fueron adquiridos genes que codifican

resistencia a ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol. Lo anterior, fue definido como multi-fármaco-resistencia (Bythwood et al. 2019). Por lo cual, la fluoroquinolona, ciprofloxacino se convirtió en la primera línea de fármacos para el tratamiento a partir de la emergencia global de aislados de *Salmonella* multi-fármaco-resistentes (Bythwood et al. 2019). Sin embargo, debido a fallas en el tratamiento, dieron lugar a una disminución de la susceptibilidad a la ciprofloxacina, probablemente por presencia de plásmido codificante de genes de resistencia a quinolonas (*qnr*). Esto, llevó al uso de cefalosporinas de tercera generación, como ceftriaxona para tratar fiebre entérica (Harish and Menezes 2015).

Aparte de la resistencia de *Salmonella* a antibióticos, existe otro mecanismo de virulencia que les concede resistencia a los antibióticos y esto es su capacidad para formar biofilms. La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biofilm ofrece cuatro ventajas importantes: (1) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (2) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (3) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (4) posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia (Amrutha et al. 2017).

4 Biofilms de *Salmonella*

Además de la resistencia de microorganismos a los antibióticos por los mecanismos antes mencionados, existen otros factores de virulencia que hacen posible la resistencia de las bacterias a ellos. Entre estos mecanismos podemos citar la capacidad que tienen las bacterias para formar

biofilms (Donlan 2002). Absolutamente todas las bacterias; patógenas o no patógenas, tienen la capacidad de formar biofilms, tal como la bacteria *Salmonella* (Dunne 2002; Costerton 1995).

Los biofilms son comunidades sésiles de microorganismos que se encuentran adheridos a una superficie firmemente en una matriz extracelular como agregados, lo cual les permite a las bacterias resistir condiciones ambientales hostiles como inanición y desecación, así como causar enfermedades crónicas (Roy et al. 2017). Además, los biofilms protegen a las bacterias contra el sistema inmunológico del hospedero y también, aumenta su resistencia contra antibióticos convencionales alrededor de 1,000 veces, lo cual depende de la naturaleza y estructura del biofilm (Roy et al. 2017). Los componentes de la matriz extracelular de los biofilms de *Salmonella* pueden variar considerablemente, y esto depende de las condiciones del medio ambiente donde se formen y persistan los biofilms. Se ha documentado que el morfotipo BDAR de *Salmonella* es el más estudiado hasta el momento. El exopolisacárido (EPS), principal componente de los biofilm puede variar también dependiendo del ambiente donde se establezca. En el morfotipo rdar de *Salmonella*, el EPS se constituye de proteínas (que constituyen las fimbrias, proteínas BapA y Tafi y curli), celulosa, y antígeno capsular del tipo O. Además, contienen LPS (lipopolisacárido) (Hermans et al. 2011; Marshall et al. 2014).

La formación de los biofilms consiste en 3 etapas (Fig. 1). La etapa inicial involucra el establecimiento de células a una superficie, seguido de su unión para formar microcolonias y la diferenciación final del biofilm para formar una estructura madura. Proteínas de superficie bacteriana como OmpA, proteínas de unión a fibronectina, proteína A, SasG, proteína asociada a biofilm (BAP), entre otras, están involucradas en la formación de biofilms, principalmente en la fase inicial de establecimiento (Roy et al. 2017).

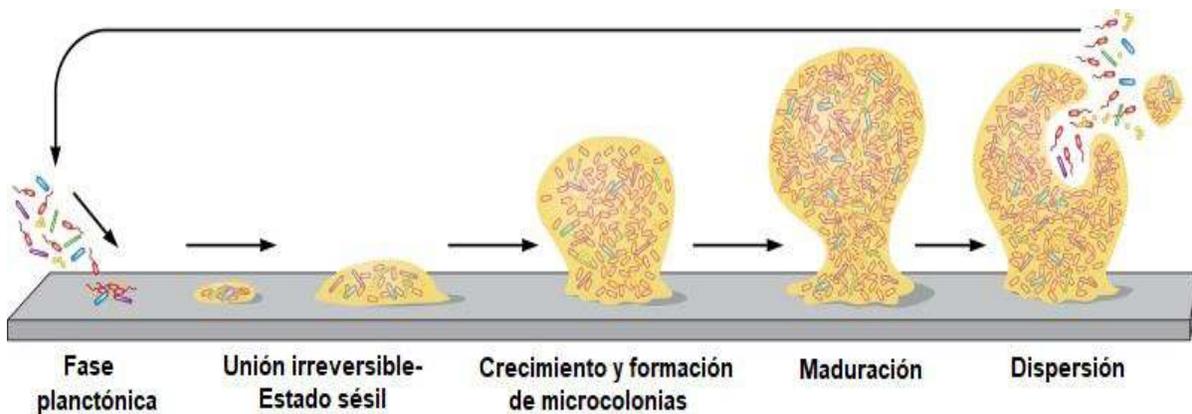


Figura 1. Etapas de formación de un biofilm. Una vez que las bacterias planctónicas se han adherido a una superficie (biótica o abiótica), se unen y forman microcolonias que posteriormente forman la estructura de un biofilm maduro, dentro del cual estas bacterias se multiplican y finalmente se dispersan, colonizando nuevas superficies (Magana et al. 2018).

La contaminación bacteriana de superficies en entornos de procesamiento de alimentos, puede dar como resultado la formación de biofilm, lo que supone un gran riesgo de contaminación de los alimentos que vayan a ser procesados posteriormente en esas superficies.

La descontaminación efectiva de las superficies contaminadas con biofilms son un gran reto para los investigadores dedicados a la industria de procesamiento de alimentos, etc. Diversos estudios realizados por Corcoran y col. (2014), utilizando un reactor para la estabilización del biofilm, examinaron las actividades biofilmicidas del hipoclorito de sodio, del hidróxido de sodio y del cloruro de benzalconio frente a dos biofilms de *Salmonella*, uno de *Salmonella* con un corto periodo de maduración (48 h) y otro relativamente maduro (168 h) (Corcoran et al. 2014). Los 3 agentes resultaron efectivos en la reducción de los recuentos viables de *Salmonella*; sin embargo, sólo el

hidróxido de sodio dio como resultado la erradicación del biofilm inicial, y ninguno de los tres consiguió la erradicación del biofilm maduro, incluso con un tiempo de contacto de 90 minutos (Corcoran et al. 2014).

Los biofilms de *Salmonella* contribuyen tanto a la resistencia como a la persistencia de las bacterias en superficies abióticas y bióticas. En cuanto a las superficies abióticas; estas pueden ser el plástico, vidrio, cañas de pescar e inclusive en acero inoxidable. En superficies bióticas los biofilms de *Salmonella* pueden encontrarse colonizando como comunidad en el intestino de animales domésticos, en plantas, etc., de allí que sean un importante causante de infecciones adquiridas a través de los alimentos (Corcoran et al. 2014; Gaertner et al. 2011).

Como pudimos constatar, el control de infecciones a causa de la bacteria *Salmonella Typhimurium* es un problema persistente a nivel mundial. Cada vez son más las cepas de *S. Typhimurium* resistentes a los antibióticos o con capacidad para formar biofilms que causan problemas tanto a la industria alimentaria como a la población humana. Es por ello que en respuesta a este problema, diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar estrategias de prevención y tratamiento, a fin de que se pueda contar con nuevos productos con potencial para hacer frente a las infecciones causadas por esta bacteria y también por otros microorganismos patógenos (Guani-Guerra et al. 2010; Joerger 2003).

Entre las estrategias destacadas se han realizado investigaciones en bacteriófagos, hidrolasas de paredes celulares bacterianas y peptidos o proteínas antimicrobianos (Parisien et al. 2008). En cuanto a las proteínas y peptidos antibacterianos, entre estos destacan las proteínas y peptidos efectores de la respuesta inmune de mamíferos, que tienen propiedades antimicrobianas de amplio

espectro tal como lo son la Lisozima, las histidinas, dermacepinas, etc., y la Lactoferrina (LF), proteína que ha sido el objeto de estudio de nuestro grupo de colaboradores (Parisien et al. 2008; Lizzi et al. 2009b). La lactoferrina usualmente es encontrada en las células del acino, que revisten glándulas secretoras, por lo que es común encontrar a LF en secreciones de mucosas. Cuando esta proteína se ingiere por el organismo humano, durante el pasaje por sistema digestivo es digerida por la pepsina gástrica, generando péptidos conocidos como lactoferricinas, los cuales se ha demostrado que son las porciones responsables de la actividad microbicida y antitumoral de esta proteína, la cual es multifuncional (Tomita et al. 1991; Guani-Guerra et al. 2010). En la siguiente sección explicaremos a detalle la descripción y funciones de la LF y sus péptidos.

B LACTOFERRINA

1 Generalidades

Lactoferrina (LF), es una glicoproteína del sistema inmune que consiste en 703 aminoácidos, con un peso molecular de 80 kDa (Lizzi et al. 2009a). La LF es una glicoproteína perteneciente a la familia de las transferrinas, descrita por Sörensen desde 1939, pero fue hasta que se aisló de la leche de bovinas cuando se iniciaron los estudios en su estructura, funciones y aplicaciones (Arnold et al. 1980). Esta proteína se puede encontrar en la leche, en secreciones de mucosas, secretada por células epiteliales y neutrófilos. LF se sintetiza principalmente en la glándula mamaria en respuesta a la hormona prolactina durante el periodo de la lactancia, llegándose a secretar concentraciones de 1-2 mg/mL en leche madura y hasta 15 mg/mL en el calostro. LF también puede encontrarse en el calostro de algunas especies de mamíferos tales como bovinos, ratón, conejo, camello, etc., aunque también es muy abundante en la leche madura. En el útero, se sintetiza en respuesta a estrógenos, y en otros revestimientos mucosos. Además, se sabe que la síntesis de LF también es regulada por hormonas (Baker and Baker 2009; Lizzi et al. 2009a). También es sintetizada y secretada por las células acinares y glándulas secretorias que revisten sitios mucosos, por ello es común encontrarla en secreciones pulmonares, intestinales, vaginales, entre otros, y en fluidos corporales tales como lágrimas y saliva (Masson et al. 1965).

2 Estructura

LF es una glicoproteína monomérica que tiene un peso molecular de 80 kDa, compuesta por una cadena polipeptídica de 703 restos de aminoácidos (Aisen and Leibman 1972). LF, al igual que otros miembros de su familia, se divide en dos lóbulos conocidos como lóbulos N y lóbulo C. Cada

lóbulo está a su vez subdividido en dos dominios: N1 y N2 del extremo amino, C1 y C2 del extremo carboxilo. Existe un sitio fijador de Fe^{3+} localizado en cada uno de los lóbulos N y son idénticos entre sí. La LF puede existir en tres isoformas LF- β y LF- λ con actividad de ARNasa, y LF- α que no presenta actividad de ARNsa (Drago-Serrano et al. 2017; Baker et al. 1991). En la naturaleza la LF suele encontrarse en su forma libre de hierro, y así se lo conoce como apo-lactoferrina (apo-LF), en este estado la proteína presenta una estructura relajada y expone aminoácidos de carga catiónica. Por otro lado, cuando la LF quela los dos átomos de hierro, a la proteína se le conoce como holo-lactoferrina (holo-LF), en esta forma la proteína adquiere una conformación tridimensional compacta porque se estabiliza al unir los átomos de hierro (Baker et al. 1991; Baker and Baker 2005, 2009).

3 Péptidos derivados de Lactoferrina

En la mucosa intestinal, la LF es una de las principales proteínas encargadas de llevar a cabo la inmunidad innata inespecífica ante una gran gama de microorganismos patógenos, que se ha podido identificar y purificar a partir de la leche bovina. Algunos péptidos antimicrobianos se originan a partir de las proteínas precursoras a través de la digestión proteolítica (Bellamy et al. 1992). Lactoferricina B (LFCina B) se libera de bLF por digestión con pepsina y tiene una actividad antibacteriana, antimicótica y antiviral (Orsi 2004; Drago-Serrano et al. 2017; Flores-Villaseñor et al. 2010; Flores-Villasenor et al. 2010). En 1982, Wayne Bellamy y col. reportaron un fragmento que se producía *in vivo* por la degradación de la bLF en intestino con la enzima gástrica pepsina y después demostraron que éste era el responsable de la acción bactericida de bLF. Posteriormente, el mismo grupo reportó que en bLF, la mayor parte de su actividad es llevado a cabo por el fragmento de LFCina B, y que ésta molécula corresponde a una parte del dominio N1 (Bellamy et al. 1992). Varios estudios sobre LFCina B y relacionados con péptidos derivados han demostrado que tiene actividad

de amplio espectro contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, LFcina B exhibe acción antifúngica, antiviral y actividad antitumoral, además de desempeñar un papel regulador en la respuesta inmune adaptativa, ya que tiene propiedades anti-inflamatorias (Bellamy et al. 1992; Brock 2002; Farnaud and Evans 2003).

En el 2004 se obtuvo otro péptido derivado de bLF denominado Lactoferrampina (LFampina). Este es un péptido localizado en la porción amino-terminal N1 con propiedades antimicrobianas tales como las reportadas para LFcina. LFampina consta de los residuos 265-284 de bLF. Este péptido se ha reportado que presenta actividad antimicrobiana contra *Candida albicans* y bacterias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (van der Kraan et al. 2004).

En el 2007, el Dr. Bolscher desarrolló los péptidos sintéticos LFcina17-30 y LFampina265-284 y los unió a través de una lisina mediante síntesis química y obtuvo un nuevo péptido al que denominó LFquimera (Bolscher et al. 2009a; Bolscher et al. 2006; Bolscher et al. 2009b). LFquimera es un péptido con una carga positiva neta mayor que sus péptidos de origen, y con una conformación espacial similar a bLF (Fig. 2), interacciona más fuertemente con modelos de membranas negativamente cargadas, pero lo más importante y más interesante es, que en altas concentraciones de sal no pierde su actividad bactericida o fungicida (Bolscher 2007; León-Sicairos 2007; Leon-Sicairos et al. 2009).

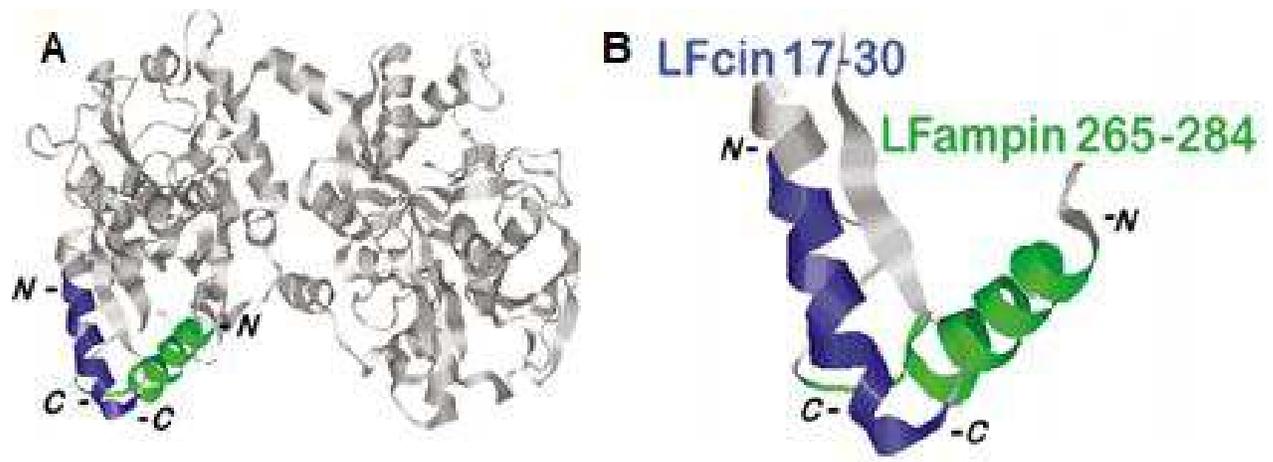


Figura 2. Estructura de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera. En la imagen A se observa la estructura de bLF y en la imagen B, la estructura de LFquimera, constituida por los péptidos LFcina17-30 (azul) y LFampina264-285 (verde).

4 Actividad antimicrobiana

a Mecanismo de acción

Se han descrito dos mecanismos antimicrobianos diferentes de LF, uno relacionado con su capacidad de unión al hierro (microbiostático) y el otro a una función microbicida directa. El efecto microbiostático de LF está relacionado con capacidad de esta proteína de unirse al hierro, lo cual priva a las bacterias que requieren de hierro para su crecimiento, cambiando su conformación especial de apo-Lf a holo-Lf, actuando como quelante de hierro (Leon-Sicairos et al. 2014; Chapple et al. 1998).

Otro mecanismo bactericida de LF, independiente del hierro, es que interactúa directamente con las membranas microbianas, interrumpiendo la permeabilidad celular a través de la dispersión de los componentes de la membrana, tales como los lípidos, carbohidratos y proteínas, causando la muerte del microorganismo (Shaper et al. 2004). Esto se debe a la carga catiónica de LF (Papenfort and Bassler 2016). Esta interacción se ha observado tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas. Los estudios con bacterias Gram-positivas como *Streptococcus mutans*, *Micrococcus* sp y *Clostridium* sp, muestran que, tanto la LF humana, como la bovina, son capaces de unirse a las superficies bacterianas, gracias a su carga positiva (Orsi 2004; Brock 2002).

En bacterias Gram-negativas como *Vibrio cholerae* y *E. coli*, se ha detectado la interacción de la LF con la superficie bacteriana, seguida de la liberación de lipopolisacárido (LPS), el aumento en la permeabilidad de la membrana y la liberación del contenido citoplasmático de la bacteria. El LPS es el componente endotóxico de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, que se adhiere a receptores de la célula hospedera, como uno de los primeros pasos para la infección. De allí que una de las principales estrategias para prevenir la unión de LPS a las células eucariotas, sea la búsqueda de compuestos con capacidad de alterar esta estructura (Brock 2002).

Se cree que el extremo N terminal de LF, cargado positivamente, interrumpe la interacción entre el LPS y los cationes bacterianos (Ca^{+2} y Mg^{+2}). Esta acción induce la liberación de LPS de la pared celular, por lo que algunos fosfolípidos de la membrana interna de la bacteria ocupan el lugar del LPS para impedir la alteración de la superficie. Estos cambios provocan a su vez un aumento en la permeabilidad de la membrana con el consecuente daño a la bacteria. Este aumento en la permeabilidad también facilita el ataque de otras proteínas de defensa hacia la bacteria, como la

lisozima e inmunoglobulinas, las cuales han mostrado tener un efecto sinérgico con LF (Vogel 2012; Weinberg 2003; Velusamy et al. 2014).

b Antecedentes previos

LF inhibe el crecimiento, tanto de bacterias Gram negativas como Gram positivas, entre ellas, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis* (Leon-Sicairos, Angulo-Zamudio et al. 2014). También, presenta efecto bactericida y bacteriostático *in vivo* contra *Helicobacter pylori* (ref). De igual forma, LF disminuyó la carga bacteriana de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en intestino, en bazo e hígado (Flores-Villaseñor et al. 2010). LF también se ha observado que presenta actividad sobre cepas resistentes a antibióticos de *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y de *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina (Huo et al. 2011).

En este sentido, estudios *in vitro* han revelado que LF inhibe la adhesión de ETEC, EPEC, EHEC y EAEC a las células epiteliales y la mucosa intestinal, incluso la cepa EHEC O157: H7 y EPEC multi-fármaco-resistente es susceptible a LF y sus péptidos derivados, inhibiendo su crecimiento y unión a las células epiteliales intestinales, con LFquimera como el péptido con mayor efectividad (Flores-Villasenor et al. 2012).

Adicionalmente, se ha reportado que LF y los péptidos sintéticos derivados LFcina17-30, LFampina265-284 y LFquimera presentan actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, de manera dependiente de la concentración, y LFquimera en mayor grado que LF y sus péptidos

constitutivos (Lupetti et al. 2004). También, en *S. aureus*, se disminuye su viabilidad en un 90% bajo el tratamiento de LF y péptidos sintéticos derivados (Lfcina17-30, LFampina265-284 and LFquimera) (Flores-Villasenor et al. 2010; Aguila et al. 2001).

Leon-Sicairos, et al. (2009) demostró que LFquimera presenta efecto bactericida contra *V. parahaemolyticus*, mientras que ambos péptidos constitutivos (Lfcin17-30 y Lfampin265-284) no tienen ningún efecto (Leon-Sicairos et al. 2009). LF también ha presentado capacidad para inhibir la formación de biofilms bacterianos (Singh et al. 2002). Esto se ha observado en etapas de formación de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Tanida et al. 2006), donde la escases de hierro debido a apo-LF afecta la adhesión evitando la formación la biofilms (Eichenholz et al. 1992; Bhatia et al. 2005). De esta forma, LF bloquea la unión inicial de la bacteria al hospedero, inhibiendo la unión de *E. coli* a receptores de HEp-2, impidiendo la formación de biofilms (Pammi and Abrams 2015; Sharma and Shastri 2016; Barreto Arce et al. 2016). En otro estudio, LF y algunos fragmentos con los residuos 473 a 538 mostraron capacidad para inhibir la adherencia de *Streptococcus mutans* a películas salivales (Oho et al. 2002). Mientras que, en *Streptococcus pneumonie* se ha observado que bLF inhibe la formación de biofilm al inhibir la expresión del gen luxS que participan en etapas iniciales en la formación de biofilms (Velusamy et al. 2014).

Con respecto a *S. Typhimurium*, se ha observado que LF causa daños a la membrana bacteriana, además de evitar su adhesión a células hospederas, lo cual se ve intensificado por el efecto bactericida de la lisozima (Testa 2002; Wilson and Salyers 2010). Incluso, se han reportado estudios *in vivo* donde ratones infectados con *Salmonella* y tratados con LF presentan mayor capacidad de sobrevivencia y menores signos de infección y daño (Aguila et al. 2001). De hecho, se

ha demostrado que bLF ejerce un efecto bacteriostático dependiente de hierro en *S. Typhimurium*, inhibiendo la adherencia e invasión en cultivos celulares (Park et al. 2013; Klevens et al. 2007).

Además de la capacidad bactericida y bacteriostática de LF, esta también aumenta el efecto de antibióticos. Por ejemplo, se ha observado que LF no solo aumenta la actividad inhibitoria de la penicilina hasta 4 veces en la mayoría de las cepas de *S. aureus* susceptibles a la penicilina, sino que aumenta la actividad inhibidora de 4 a 16 veces en las cepas resistentes a la penicilina. De hecho, LF reduce la actividad de la beta-lactamasa en las cepas de *S. aureus* que producen esta enzima, reprimiendo su gen de manera significativa (Tsuda et al. 2002). Además, la adición de LF produce un efecto sinérgico para aumentar la capacidad del antibiótico para matar a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), se probó LF de camello y LF humano, ambos mostraron un índice de concentración de inhibición fraccional (FICI) menor de 0.5, lo que indica sinergismo con antibióticos, como vancomicina y oxacilina para matar MRSA (Redwan et al. 2016; Leon-Sicairos et al. 2006; Flores-Villasenor et al. 2010). De la misma forma, los péptidos LFcina17-30 y LFampina265-284, además de presentar actividad antibacteriana contra *E. coli* y MRSA enteropatógenas resistentes a múltiples antibióticos, aumentan sinérgicamente el efecto de la ampicilina en dosis bajas y también de metronidazol en algunos parásitos (Tanaka et al. 2000; Leon-Sicairos et al. 2009).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Salmonella es la bacteria que ocasiona salmonelosis. La OMS reporta que la fuente principal de adquisición de salmonelosis es el consumir alimentos contaminados con esta bacteria y son una de las principales causas de enfermedades diarreicas a nivel mundial, ya que cada año enferman alrededor de 550 millones de personas, de las cuales 220 millones son niños menores de 5 años. Por otra parte, tan sólo en los Estados Unidos de América se presentaron 46,623 casos de infecciones provocadas por *Salmonella*, y de estos casos, el principal serotipo responsables es *Salmonella enteritidis* con 7,830 casos (16.8 %). En México, en el año 2017 se reportaron 92,013 casos de salmonelosis producidos por *Salmonella enteritidis*. Además de la alta incidencia de la salmonelosis en los últimos años, se ha reportado que *Salmonella* y sus serotipos son resistentes a los principales antibióticos utilizados para su control, y estas pueden formar biofilms en superficies, suelos, plantas de consumo humano y en animales domésticos, que a su vez hace más complicado su control y eliminación. Por todo lo anterior, fue necesaria la búsqueda de compuestos, ya sea de origen natural ó sintético; que tengan capacidad bacterioestática y biofilmicida, especialmente contra los serotipos de *Salmonella* causantes de infecciones entéricas en humanos. En este sentido, previamente se ha demostrado por nuestro grupo de trabajo que bLF y LFquimera tienen actividad bactericida en cepas resistentes a antibióticos como *V. cholerae* y biofilmicida en *S. pneumoniae*, por lo que en este estudio propuso estudiar el efecto que tienen bLF y LFquimera en biofilms formados por *Salmonella Typhimurium* sobre células Caco-2.

V JUSTIFICACIÓN

Lactoferrina es una proteína del sistema inmune innato que cuenta con un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como también actividad anti-biofilm. De esta proteína se derivan péptidos sintéticos como LFquimera, el cual es resultado de la fusión del péptido sintético LFcina17-30 y LFampina 264-285, conservando las regiones activas de bLF, con una conformación espacial similar, además de una mayor resistencia y estabilidad a la degradación. Se han reportado estudios donde bLF inhibe el crecimiento de *Salmonella*, presentando efecto bacteriostático, además de evitar la adherencia y establecimiento en tejidos celulares. Sin embargo, no se ha determinado si bLF y LFquimera presentan efecto contra biofilms de aislados clínicos de *Salmonella* Typhimurium multi-fármaco-resistentes, pre-formados y maduros, así como tampoco ya establecidos en modelos de células intestinales como Caco-2, ni el efecto sinérgico con antibióticos al cual son resistentes. Los resultados del presente proyecto muestran el potencial de bLF y LFquimera como agentes biofilmicidas de *S. Typhimurium*, lo cual abre las puertas a nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas transmitidas por los alimentos.

VI HIPÓTESIS

Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera presentan actividad anti-biofilm en biofilms preformados y maduros de *Salmonella* Typhimurium multi-fármaco-resistente establecidos sobre células Caco-2.

VII OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la Lactoferrina bovina y el péptido Lactoferrina quimera sobre adherencia y formación de biofilms de *Salmonella* Typhimurium multi-fármaco-resistente en células Caco-2.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Establecer el efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en la inhibición de la adherencia y formación de biofilms de *Salmonella* Typhimurium multi-fármaco-resistente en células Caco-2.
- 2) Estandarizar la formación de biofilms maduros de *Salmonella* Typhimurium multi-fármaco-resistente en células Caco-2.
- 3) Evaluar el efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera sobre biofilms maduros de *Salmonella* Typhimurium multi-fármaco-resistente establecidos en células Caco-2.
- 4) Determinar el efecto sinérgico entre Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera con el antibiótico cloranfenicol en biofilms maduros de *Salmonella* Typhimurium multi-fármaco-resistente establecidos en células Caco-2.

VIII MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

1 Lactoferrina bovina y péptido sintético derivado

La proteína Lactoferrina bovina (bLF) ($\geq 85\%$ SDS-PAGE) fue obtenida de la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), y el péptido sintético Lactoferrina quimera fue donado por el Dr. Jan Bolscher (*Department of Oral Biochemistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam, University of Amsterdam and VU University Amsterdam, The Netherlands*). Este péptido resulta de la fusión de los péptidos sintéticos LFcina17-30 y LFampina264-285.

2 Cultivo de *Salmonella*

La cepa de *Salmonella* Typhimurium utilizada en este estudio fue previamente aislada de un paciente con salmonelosis, se caracterizó mediante pruebas bioquímicas y serotipificada por el InDRE, finalmente, se determinó que presenta resistencia a los siguientes antibióticos: tetraciclina, ampicilina cefotaxima, ceftazidima, sulfametoxazol, ácido nalidíxico, cloranfenicol y gentamicina. *S.* Typhimurium fue sembrada en medio Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) agar durante 24 h 37 °C, posteriormente se inoculó en medio BHI líquido durante 2.5 h a 37 °C. La cepa bacteriana se conservó en medio de cultivo adicionado con 10% de glicerol a -80 °C, para su posterior uso.

3 Cultivo de células Caco-2

En este trabajo se utilizó la línea celular intestinal Caco-2 (ATCC® HTB-37™), la cual es derivada de un adenocarcinoma colorectal. Estas fueron descongeladas bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar vertical (Telstar, Terrassa, España). Las células contenidas se depositaron en un frasco de cultivo celular de 25 cm² con tapón de rosca (Corning, NY, EUA) con 9 mL de medio DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% antibiótico (Estreptomicina 10 mg/mL + Penicilina 10,000 UI/mL) e incubadas a 37°C a una atmósfera de 5% de CO₂. Para el mantenimiento de la línea celular, se realizaron pases consecutivos cada cinco días dependiendo de la densidad celular observada. Para ello, las células se lavaron con PBS y se adicionaron 500 µL de 0.25% Tripsina-EDTA incubándose durante 5 min a 37 °C. Las células se resuspendieron en medio de cultivo y se realizó el pase en relación 1:10 ó 1:5 dependiendo los requerimientos. Para la preservación de las células, el medio de cultivo se suplementó con 5% Dimetilsulfóxico (DMSO) y fueron congeladas a -70°C durante 5 días y posteriormente almacenados en Nitrógeno líquido a -196°C.

a Conteo y determinación de viabilidad celular

Para realizar el conteo y determinar la viabilidad del cultivo se utilizaron las células tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo. Para esto se utilizó una mezcla 1:1 de suspensión celular y 0.4% azul de tripano, la cual se colocó en la cámara de Neubauer. Finalmente se observó al Microscopio de campo claro, contando las células sin teñir (viables) y teñidas en azul (no viables).

El porcentaje de viabilidad se determinó con la siguiente formula:

$$\text{Células viables (\%)} = \frac{(\text{Número total de células viables per mL de alícuota})(2)}{(\text{Número total de células per mL de alícuota})(2)} \times 100$$

Solo se utilizaron cultivos con una viabilidad mayor del 95%.

B METODOLOGÍA

1 Cinética de inhibición de crecimiento de *Salmonella*

Para determinar las concentraciones de bLF y LFquimera que se utilizarán en los próximos experimentos, se llevó a cabo un experimento de cinética de crecimiento de *Salmonella* en estado planctónico. Para esto, se partió de un cultivo de *S. Typhimurium* (1×10^8 UFC/mL) previamente cuantificado y se inocularon 1×10^5 UFC/mL en una placa de ELISA de 96 pocillos. Posteriormente, *S. Typhimurium* se incubó con 75, 300, 600, 800 y 1000 μM de bLF ó 1, 5, 10, y 20 μM de LFquimera durante 6 h en agitación constante a 37 °C. La densidad óptica se determinó cada 30 min en un lector de placas Multiskan™ FC Microplate Photometer (ThermoFisher Scientific). Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos resultantes fueron analizados mediante ANOVA.

2 Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en la formación de biofilms de *S. Typhimurium* en células Caco-2

Para cuantificar el efecto de bLF y LFquimera en la formación de biofilms de *S. Typhimurium* en Caco-2, se sembraron 1×10^4 células por pocillo en medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomicina, en placas de 24 pocillos incubándose durante 24 h a 37

°C a una atmósfera de 5% de CO₂. Pevio a adiconar el cultivo bacteriano, se reemplazó el medio por DMEM sin antibióticos. Posteriormente, se inocularon 1X10⁵ UFC/mL de *S. Typhimurium* por pocillo en combinación con los tratamientos de bLF (600 y 800 µM), así como de LFquimera (10 y 20 µM). Como control, se utilizaron cultivos de *S. Typhimurium* sin tratamiento y de *S. Typhimurium* tratado con ciprofloxacino (5 µg). Las células se incubaron durante 4 y 6 h a 37 °C para cuantificar la biomasa de los biofilms.

Para la cuantificación de la biomasa del biofilm, se retiró el sobrenadante, y las células se lavaron con PBS. Después, los pocillos se rasparon para desprender el biofilm y finalmente, la biopelícula se resuspendió para realizar diluciones seriadas en PBS 1X estéril, mismas que posteriormente se sembraron en placas de BHI agar incubándose durante 24 h a 37 °C. También se cuantificaron las bacterias presentes en el sobrenadante mediante conteo de UFC/mL. Los resultados fueron obtenidos como UFC/mL de una serie de 3 experimentos independientes.

3 Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en biofilms maduros establecidos de *S. Typhimurium* en células Caco-2

a Estandarización de biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* en células Caco-2

La estandarización de biofilms maduros de *S. Typhimurium* se llevó a cabo en células de Caco-2 sembradas en placas de 24 pocillos (1X10⁴ por pocillo) utilizando medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomicina. Estas se incubaron durante 24 h a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂. Antes de adiconar el cultivo bacteriano, se reemplazó el medio por DMEM sin antibióticos. Posteriormente, se agregaron 1X10⁵ UFC/mL de *Salmonella Typhimurium* y

se co-incubó con Caco-2 durante 24 h a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂. Finalmente, para cuantificar la biomasa del biofilm se realizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente. Las células se lavaron con PBS, los pocillos se rasparon para desprender el biofilm y se realizaron diluciones seriadas, las cuales se sembraron en BHI agar, incubándose durante 24 h a 37 °C. Los resultados fueron obtenidos como UFC/mL.

b Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en superficie

Una vez estandarizada la formación de biofilms maduros en Caco-2, se llevó a cabo el ensayo de destrucción de biofilms maduros establecidos en placas de 24 pocillos (sin células), para determinar las concentraciones de bLF y LFquimera a utilizar. Para esto, se adicionaron 1X10⁵ UFC/mL de *S. Typhimurium* por pocillo, en placas de 24 pocillos y se incubó durante 24 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez establecidos los biofilms maduros, se retiraron las bacterias planctónicas presentes en el sobrenadante lavando con PBS y se adicionó nuevo medio de cultivo. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos de bLF (600, 800 y 1000 µM), LFquimera (10 y 20 µM), y como control negativo (inhibición de crecimiento bacteriano) se utilizó el antibiótico ciprofloxacino (5 µg), y como control positivo de crecimiento, se utilizaron las células sin tratar. La placa con los tratamientos se incubó durante 4 y 6 h a 37 °C. También se realizó otra serie de experimentos probando las concentraciones 150 y 300 µM de bLF durante 8 y 12 h de incubación. Al finalizar la incubación con los tratamientos, los biofilms se lavaron con PBS y se llevó a cabo la cuantificación de biomasa del biofilm, como se mencionó anteriormente.

c Efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en células Caco-2

Este ensayo se realizó tal como el anterior, solo que los biofilms maduros se establecieron sobre células Caco-2. Para esto, se sembraron 1×10^4 células de Caco-2 por pocillo en placas de 24 pocillos con medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomicina. Después, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂. Antes de adicionar el cultivo bacteriano, se reemplazó el medio por DMEM sin antibióticos. Posteriormente, se adicionaron 1×10^5 UFC/mL de *S. Typhimurium* por pocillo y se incubó nuevamente durante 24 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez establecidos los biofilms maduros, se retiraron las bacterias planctónicas presentes en el sobrenadante lavando con PBS y después se adicionó nuevamente medio DMEM sin antibióticos. Consecutivamente, se aplicaron los tratamientos de bLF (150, 300, 600, 800 y 1000 μM), LFquimera (10 y 20 μM), y ciprofloxacino (5 μg). Como control positivo de crecimiento se utilizaron las células con biofilms maduros de *S. Typhimurium* sin tratar. La placa con los tratamientos se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Debido a los resultados obtenidos en los experimentos descritos previamente, se realizaron ensayos probando las concentraciones 150 y 300 μM de bLF (además de las anteriores), durante 8 y 12 h de incubación. Al finalizar la incubación con los tratamientos, los biofilms se lavaron con PBS y se llevó a cabo la cuantificación de biomasa del biofilm, como se mencionó anteriormente, mediante diluciones seriadas sembradas en BHI agar, incubadas durante 24 h 37°C.

d Visualización del efecto de Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera en biofilms maduros en células Caco-2 mediante Microscopía

Para visualizar el efecto de bLF y LFquimera en biofilms maduros de *S. Typhimurium* establecidos en Caco-2. Las células se sembraron en cámaras de cultivo sobre portaobjetos de 8 pocillos (ThermoFisher Scientific), 1×10^4 células por pocillo en medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomicina. Estas se incubaron durante 24 h a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂. Antes de adicionar el cultivo bacteriano, se reemplazó el medio por DMEM sin antibióticos. Después, se adicionaron 1×10^5 UFC/mL de *S. Typhimurium* por pocillo y se incubó nuevamente durante 24 h a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂.

Una vez establecidos los biofilms maduros, se retiraron las bacterias planctónicas presentes en el sobrenadante lavando con PBS y se adicionó de nuevo el medio DMEM sin antibióticos. Una vez establecidos los biofilms maduros de *S. Typhimurium*, se adicionaron los tratamientos de bLF (1000 µM), LFquimera (10 µM), ciprofloxacino (5 µg), y como control las células con biofilms maduros sin tratar. La placa se incubó durante 8 h a 37 °C. Posteriormente, se retiraron los tratamientos, se lavó con PBS y se fijó con 200 µL de metanol al 70% durante 15 min. Después, las células y biofilms se tiñeron con 200 µL de Giemsa durante 30 min y se lavaron con PBS. Para finalizar, se desmontó el portaobjetos de la cámara de cultivo, se adicionaron 500 µL de gelvatol y se colocó el cubreobjetos. Las imágenes se visualizaron en el Microscopio de campo claro LMD7 Leica, con el objetivo 40x.

4 Determinación de sinergismo entre Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera con antibiótico en biofilms maduros *S. Typhimurium* establecidos en células Caco-2

a Prueba de susceptibilidad antimicrobiana (Método Kirby-Bauer)

Para determinar la susceptibilidad ó resistencia de *S. Typhimurium* a distintos antibióticos y poder seleccionar el que se utilizará en combinación con bLF y LFquimera en los próximos ensayos, se llevó a cabo la prueba de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de difusión con discos ó Kirby-Bauer. Para lo anterior, se inoculó medio líquido BHI con *S. Typhimurium* durante 12 h a 37 °C. A partir de este cultivo, se sembraron las colonias por extensión en placas con Mueller Hinton y se colocaron los sensidiscos con los siguientes antibióticos: gentamicina, ceftazidima, ciprofloxacino, ácido nalidixidico, tetraciclina, sulfametoxazol, cloranfenicol y cefotaxima. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en cada uno de los sensidiscos impregnados con el antibiótico.

La sensibilidad antimicrobiana fue determinada de acuerdo al diámetro de los halos de inhibición, medidos con un vernier digital, y clasificada como resistente, intermedio ó sensible, de acuerdo al manual del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Una vez identificado el antibiótico al cual *S. Typhimurium* fue resistente, este fue seleccionado para los siguientes experimentos.

b Evaluación de la resistencia a cloranfenicol por *S. Typhimurium* mediante el método de macrodilución

Para realizar este ensayo, se sembraron 1×10^5 UFC/mL de *S. Typhimurium* en medio Müller Hinton en placas de 24 pocillos. Posteriormente, se adicionaron diferentes concentraciones de cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 y 40 μg), de acuerdo al manual del CLSI y se incubó durante 24 h a 37 °C. Después, se cuantificó la densidad óptica al inicio y al final de la incubación con los tratamientos mediante espectrofotometría. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas Agar de Müller Hinton, incubando después durante 24 h a 37 °C y para después cuantificar las UFC/mL en cada una de las determinaciones.

c Prueba de resistencia de biofilms maduros de *S. Typhimurium* a cloranfenicol

Este ensayo se realizó sobre biofilms maduros establecidos sobre células Caco-2. Para esto, se sembraron 1×10^4 células de Caco-2 por pocillo en placas de 24 pocillos con medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomicina incubando durante 24 h a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se reemplazó el medio por DMEM sin antibióticos. Después, se adicionaron 1×10^5 UFC/mL de *S. Typhimurium* por pocillo y se incubó nuevamente durante 24 h a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO_2 . Una vez establecidos los biofilms maduros, se retiraron las bacterias planctónicas presentes en el sobrenadante lavando con PBS y se adicionó medio DMEM. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos de cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 y 40 μg), ciprofloxacino (5 μg) en cada pocillo. Como control se utilizaron las células con biofilms maduros sin tratar. Las placas se incubaron durante 8 h a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO_2 . Al finalizar la incubación con los tratamientos, los biofilms se lavaron con PBS y se llevó a cabo la

cuantificación de la biomasa del biofilm como se mencionó anteriormente, mediante diluciones seriadas sembradas en BHI agar, incubadas durante 24 h 37°C.

d Ensayo de sinergismo entre Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera con cloranfenicol

Para determinar si bLF ó LFquimera presentan efecto sinérgico con cloranfenicol, se realizó un ensayo sobre biofilms maduros establecidos en Caco-2. Para esto, se sembraron 1×10^4 células por pocillo de células Caco-2 en medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% antibiótico y se incubó durante 24 h a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por DMEM sin SFB ni antibióticos y se adicionaron 1×10^5 UFC/mL de *S. Typhimurium*. Después, se incubó durante 24 h a 37 °C para la formación de biofilms maduros. Una vez establecido el biofilm maduro, se realizó un lavado con PBS para eliminar bacterias planctónicas, se adicionó medio DMEM y se aplicaron los tratamientos de cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32, y 40 µg) en combinación con bLF (30, 75, 150 y 300 µM) ó LFquimera (1, 2, 5 y 10 µM). Como controles, se utilizó ciprofloxacino (5 µg) y células con biofilms sin tratar y se incubó durante 8 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Los pocillos se lavaron con PBS, se raspó el fondo para desprender el biofilm y se realizaron diluciones seriadas en placas BHI agar incubándose 24 h a 37 °C. La biomasa de los biofilms se cuantificó como UFC/mL.

Para determinar el efecto sinérgico entre tratamientos, se utilizó el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI, por sus siglas en inglés, *Fractional Inhibitory Concentration Index*).

$$FICI = \frac{CMI \text{ de fármaco A en combinación}}{CMI \text{ fármaco A solo}} + \frac{CMI \text{ de fármaco B en combinación}}{CMI \text{ fármaco B solo}}$$

Donde, CMI es concentración mínima inhibitoria. Si FICI es <0.5 el efecto es sinergismo, si es >0.5 pero <1 es sinergismo parcial, si es 1, el efecto es aditivo, >1 pero <4 el efecto es indiferente y >4, antagonismo (Han et al. 2016).

e Visualización del efecto sinérgico entre Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera con cloranfenicol

El ensayo de efecto sinérgico entre bLF ó LFquimera con cloranfenicol se realizó en cámaras de cultivo sobre portaobjetos de 8 pocillos (ThermoFisher Scientific), para posteriormente visualizarse al Microscopio. Primeramente, se obtuvieron células Caco-2 y se incubaron durante 24 h a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂. Después, se adicionaron 1X10⁵ UFC/mL de *S. Typhimurium* por pocillo y se incubó nuevamente durante 24 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez establecidos los biofilms maduros, se adicionaron los tratamientos de bLF (300 µM), LFquimera (10 µM), cloranfenicol (40 µg), así como las combinaciones de bLF 300 µM más cloranfenicol 40 µg; y LFquimera 10 µM más cloranfenicol 1 µg, como control de inhibición de crecimiento bacteriano se usó ciprofloxacino 5 µg y como control de crecimiento se usaron las células con biofilms maduros, sin tratar. La placa con los tratamientos se incubó durante 8 h a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se retiraron los tratamientos, se lavó con PBS y se fijó con 200 µL de metanol al 70% durante 15 min. Finalmente, las células y biofilms se tiñeron con 200 µL de Giemsa durante 30 min y se lavaron con PBS. Para analizar las muestras, se desmontó el portaobjetos de la cámara de cultivo, se adicionaron 500 µL de gelvatol y se colocó el cubreobjetos. Las imágenes se visualizaron en el Microscopio de campo claro LMD7 Leica, con el objetivo 40x.

5 Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos presentados en este trabajo se realizaron y se representaron en gráficas como la media y desviación estándar de una serie de tres experimentos. Para evaluar la significancia estadística de los resultados se utilizó el software SigmaPlot, donde se aplicaron la prueba ANOVA y t-student, tomando en cuenta como estadísticamente significativos aquellos con un valor de $P < 0.05$

IX RESULTADOS

A LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA PREVIENEN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS DE *Salmonella* Typhimurium EN ESTADO PLANCTÓNICO

1 Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera previenen la formación de biofilms de *Salmonella* Typhimurium en estado planctónico, en un efecto concentración dependiente

Para determinar el efecto de bLF y LFquimera en la formación de biofilms y en biofilms establecidos de *S. Typhimurium*, inicialmente se llevó a cabo un ensayo de inhibición de crecimiento a diferentes concentraciones de bLF (75, 150, 300, 600, 800 y 1000 μM) y LFquimera (1, 5, 10 y 20 μM) en bacterias planctónicas durante 6 h, midiendo posteriormente la densidad óptica bacteriana resultante mediante espectrofotometría.

En los resultados se aprecia que bLF inhibió el crecimiento de *S. Typhimurium* en todas las concentraciones probadas (75, 150, 300, 600, 800 y 1000 μM) disminuyendo desde una unidad logarítmica a la concentración menor de 75 μM , hasta casi la eliminación total a 1000 μM , en comparación con el control de bacterias no tratadas ($P \leq 0.05$), (Figura 3, panel A). Además; puede apreciarse que el efecto es concentración dependiente.

En el caso de LFquimera, se observa que a baja concentración (1 μM) no presenta efecto contra *S. Typhimurium*, aumentando su actividad con la concentración, mostrando inhibición a 5 μM en aproximadamente una unidad logarítmica. Sólo las concentraciones de 10 y 20 μM muestran inhibición de manera significativa, disminuyendo el crecimiento en más de dos unidades

logarítmicas, comparado con el control sin tratar ($P \leq 0.05$), (Figura 3, panel B). En este caso también se observa que el efecto fue dependiente de la concentración de LFquimera.

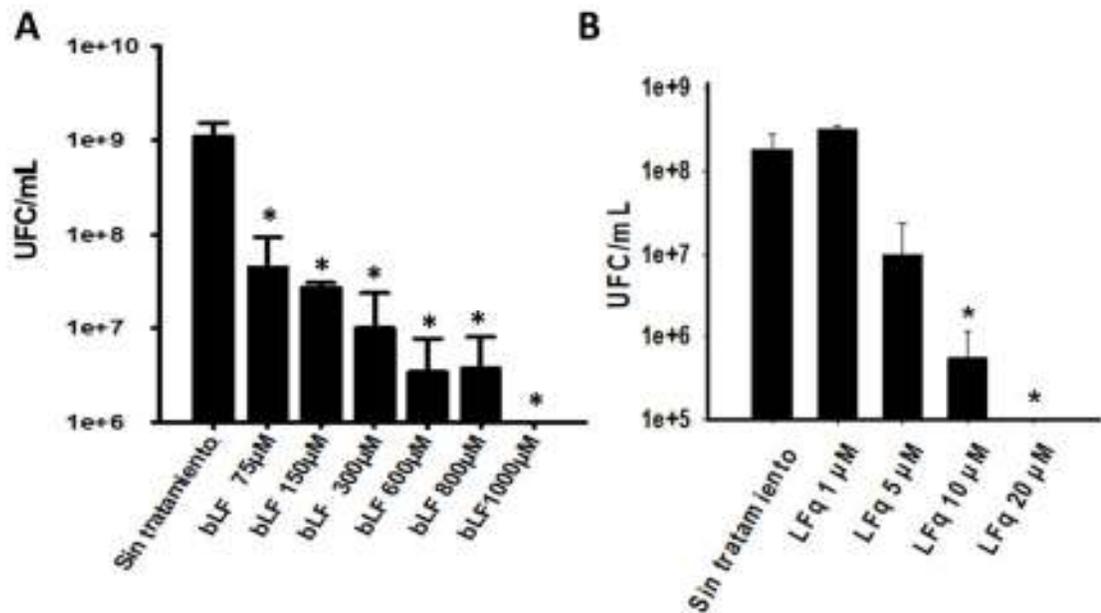


Figura 3. Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera inhiben el crecimiento en *Salmonella Typhimurium* en estado planctónico, en un efecto concentración dependiente.

Cultivos de *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) en estado planctónico se depositaron en una placa de ELISA de 96 pozos. Posteriormente, se añadieron bLF (panel A) y LFquimera (panel B) a concentraciones de 75, 150, 300, 600, 800 y 1000 μM , y 1, 5, 10 y 20 μM ; respectivamente. Las muestras se incubaron durante 6 h a 37°C. Los experimentos se realizaron por triplicado y la gráfica representa la media y desviación estándar de tres experimentos independientes de cada tratamiento expresados en UFC/mL. Para conocer la significancia estadística de cada tratamiento se usó la prueba ANOVA comparando con las muestras sin tratar. Los asteriscos indican significancia estadística $P \leq 0.05$.

2 Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera previenen la formación de biofilms de *Salmonella* Typhimurium en células Caco-2.

Una vez que se establecieron las concentraciones para inhibir a *S. Typhimurium*, se procedió a estudiar el efecto de bLF y LFquimera en el proceso de adherencia y formación de biofilms de *S. Typhimurium* sobre células Caco-2. Para ello; se probaron las concentraciones de 600 y 800 μM de bLF, y 10 ó 20 μM de LFquimera. Como control positivo (inhibidor del crecimiento de *S. Typhimurium*) se probó el antibiótico ciprofloxacino 5 μg . Durante el experimento, las moléculas se incubaron junto con *S. Typhimurium* sobre células Caco-2.

Como resultados, se encontró que bLF y LFquimera inhibieron la formación de biofilms sobre las células Caco-2 durante las 4 h de tratamiento (Figura 4), ya que el conteo de UFC/mL de *S. Typhimurium* disminuye significativamente en los tratamientos con bLF, LFquimera y ciprofloxacino en la biomasa del biofilm (Figura 4, panel B), y en los sobrenadantes (Figura 4, panel A), con respecto a las muestras sin tratar.

En el caso de bacteria planctónicas presentes en el sobrenadante (panel A), todas las concentraciones de bLF y LFquimera presentaron inhibición. LFquimera presentó mayor actividad que bLF, disminuyendo la presencia de bacterias en el sobrenadante hasta en más de 2 unidades logarítmicas comparado con el control de bacterias sin tratar. Mientras que, bLF solo inhibió el crecimiento en una unidad logarítmica a 600 μM , además a bLF 800 μM , no presentó un efecto estadísticamente significativo. Al comparar la cantidad de bacterias presentes en sobrenadante y en biofilms, se observa una gran cantidad de bacterias en sobrenadante, principalmente en el caso de las muestras tratadas con bLF. Sin embargo, la cantidad de bacterias que se adhieren y forman biofilms

disminuye considerablemente. Esto sugiere que bLF posiblemente no presente efecto bactericida en *S. Typhimurium*, pero si previene la formación de biofilms (Figura 4).

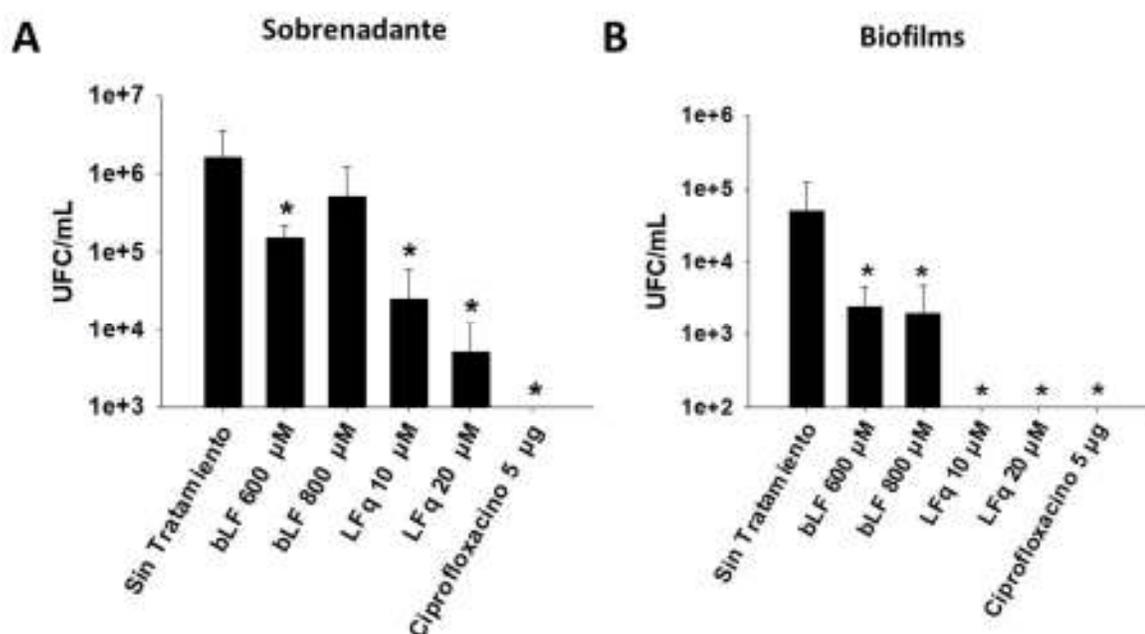


Figura 4. Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera previenen la formación de biofilms de *Salmonella Typhimurium* sobre células Caco-2 durante 4 horas de tratamiento. Células Caco-2 (1×10^4) se depositaron sobre pozos de una placa de 24 pozos en medio DMEM suplementado con SFB (10%) y penicilina/estreptomicina (1%), y se incubaron durante 24 h a una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se reemplazó el medio por DMEM sin antibióticos y se inocularon bacterias de *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) en cada pocillo, con los tratamientos de bLF (600 y 800 μM), LFquimera (10 y 20 μM). Como control positivo de inhibición de adherencia y prevención de formación de biofilm se utilizó el antibiótico ciprofloxacino (5 μg) y como control de adherencia y formación de biofilm las células no recibieron tratamiento. Las muestras se incubaron a las condiciones antes señaladas durante 4 h, y finalmente se procesaron para cuantificar la biomasa del biofilm en A) sobrenadantes ó en B) biofilms, mediante conteo de UFC/mL. Los datos fueron analizados mediante ANOVA comparándolos con el control sin tratamiento y los resultados muestran la media y desviación estándar en UFC/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los asteriscos indican una significancia estadística $P \leq 0.05$.

El ensayo de inhibición ó prevención de la formación de biofilms de *S. Typhimurium* sobre células Caco-2 también se llevó a cabo durante 6 h de tratamiento (Figura 5). Sin embargo, los resultados que se obtuvieron fueron muy similares a los observados a 4 h de incubación (Figura 4). Al igual que en el experimento de 4 h de incubación, a las 6 h también se puede observar como *S. Typhimurium* en estado planctónico es sensible al antibiótico ciprofloxacino, por lo que no hay crecimiento bacteriano en sobrenadante (Figura 5, panel A), y como consecuencia, no hubo formación de biofilm (Figura 5, panel B).

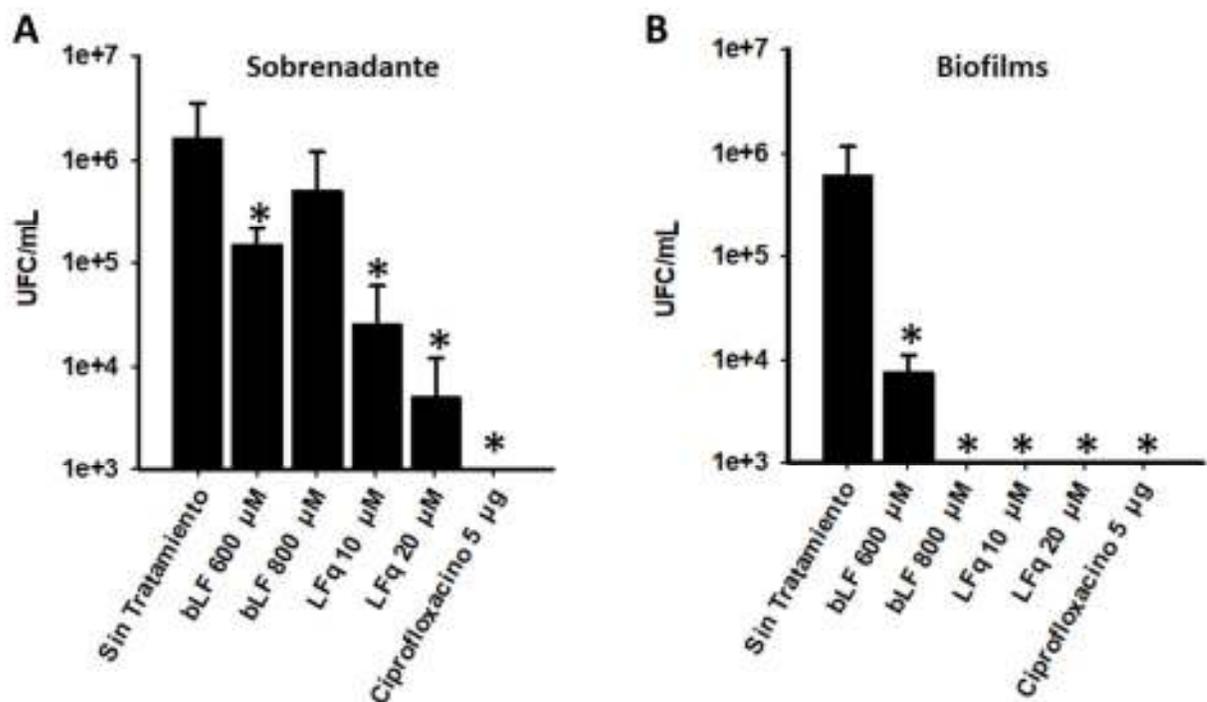


Figura 5. Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera previenen la formación de biofilms de *Salmonella Typhimurium* sobre células Caco-2 durante 6 horas de tratamiento. Células Caco-2 (1×10^4) se depositaron sobre pozos de una placa de 24 pozos en medio DMEM suplementado con SFB (10%) y penicilina/estreptomicina (1%), y se incubaron durante 24 h a una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se reemplazó el medio por DMEM sin antibióticos y se inocularon bacterias de *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) en cada pocillo, con los tratamientos de bLF (600 y 800 μM), LFquimera (10 y 20 μM). Como control positivo de inhibición de adherencia y prevención de formación de biofilm se utilizó el antibiótico ciprofloxacino (5 μg) y como control de adherencia y

formación de biofilm las células no recibieron tratamiento. Las muestras se incubaron a las condiciones antes señaladas durante 6 h, y finalmente se procesaron para cuantificar la biomasa del biofilm en A) sobrenadantes ó en B) biofilms, mediante conteo de UFC/mL. Los datos fueron analizados mediante ANOVA comparándolos con el control sin tratamiento y los resultados muestran la media y desviación estándar en UFC/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los asteriscos indican una significancia estadística $P \leq 0.05$.

B EFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA EN BIOFILMS

MADUROS DE *Salmonella* Typhimurium ESTABLECIDOS EN CÉLULAS CACO-2

1 Estandarización de biofilms de *Salmonella* Typhimurium maduros en células Caco-2

Una vez demostrado que bLF y LFquimera evitan la adherencia y formación de biofilms de *S. Typhimurium* en células Caco-2, el siguiente paso fue estandarizar la formación de biofilms de estas bacterias sobre células Caco-2. Para ello; se realizaron diferentes estrategias experimentales hasta que se logró estandarizar la formación de biofilms incubando 1×10^5 UFC/mL de *S. Typhimurium* sobre 1×10^4 de células Caco-2 durante 24 h.

Terminado el periodo de incubación, se procedió a cuantificar la biomasa del biofilm maduro y se determinó que es de 6×10^7 UFC/mL, bajo las condiciones que se describen en este experimento (Figura 6).

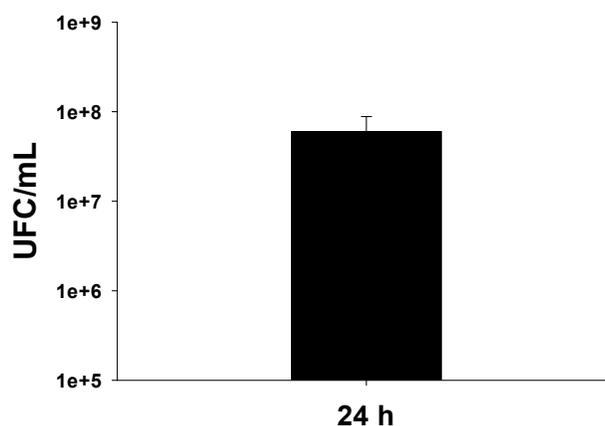


Figura 6. Establecimiento de biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* en células Caco-2. *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) se inocularon en placa con 1×10^4 de células Caco-2 en medio DMEM sin antibióticos. La placa se incubó durante 24 h a una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, para cuantificar la biomasa del biofilm se realizó el procedimiento de obtención de la biomasa del biofilm mediante lavados y raspado para realizar diluciones seriadas en medio BHI Agar como se describió previamente.

2 Lactoferrina bovina y Lactoferina quimera destruyen biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en superficie

Una vez que se estandarizó el establecimiento de biofilms maduros por parte de *S. Typhimurium* en células Caco-2, el siguiente paso fue investigar si la bLF y LFquimera tenían efecto sobre los biofilms maduros, primeramente, establecidos sobre superficie.

Al evaluar los resultados del efecto de bLF y LFquimera sobre biofilms maduros, observamos que, solo LFquimera (10 y 20 μ M), destruyen biofilms maduros a las 6 h de tratamiento (Figura 7, paneles A y B). Sin embargo, solo LFquimera a una concentración de 10 μ M tuvo un efecto para destruir el biofilm de manera estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) (Figura 7, panel B). Interesantemente, se aprecia que el antibiótico ciprofloxacino, a pesar de destruir significativamente biofilms maduros de *S. Typhimurium* a las 4 y 6 h (paneles A y B; respectivamente), se observa una

mayor densidad bacteriana que durante el proceso de formación de biofilms en estado planctónico, lo cual indica que los biofilms maduros y bien establecidos le confieren a *S. Typhimurium* cierta resistencia hacia el efecto de los antibióticos, en especial a ciprofloxacino, en comparación a los biofilms no tratados (Figura 7, paneles A y B).

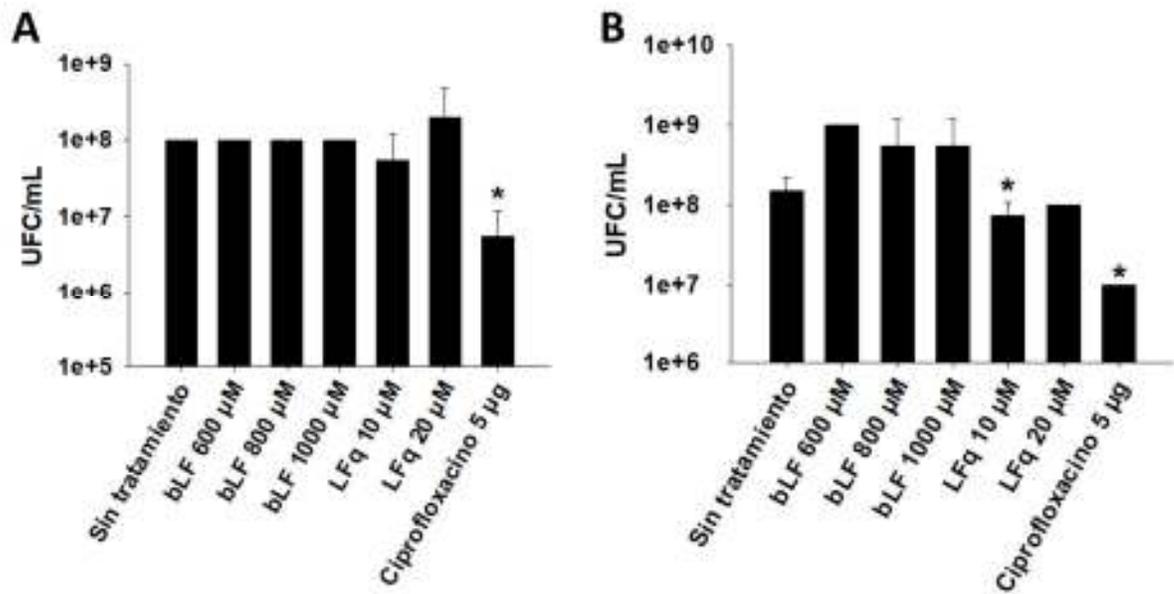


Figura 7. Lactoferrina quimera destruye biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en superficie, durante 4 y 6 h de tratamiento. *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) se inocularon en placa de 96 pocillos. La placa se incubó durante 24 h a una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se lavó y se aplicaron tratamientos de bLF (150, 300, 600, 800 y 1000 μM), LFquimera (10 y 20 μM), y ciprofloxacino (5 μg), que se usó como control de inhibición de crecimiento. Como control de crecimiento se tomaron en cuenta los biofilms sin tratar. La placa se incubó durante 4 (panel A) ó 6 (panel B) h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO_2 . Al finalizar, las muestras se procesaron para cuantificar la biomasa del biofilm en las muestras, por determinación de UFC/mL, como previamente se describió. Las gráficas representan la media y desviación estándar en UFC/mL de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Los asteriscos indican significancia estadística $P \leq 0.05$.

Debido a que el tratamiento con bLF no mostró efecto biofilmicida a las 4 y 6 h, posteriormente se realizaron ensayos durante 8 y 12 h de incubación con similares concentraciones

de bLF (150, 300, 600, 800, 1000 μM). En los resultados, se aprecia que a las 8 y 12 h después de los tratamientos (Figura 8, paneles A y B), bLF a una concentración de 1000 μM mostró actividad biofilmicida, disminuyendo la densidad bacteriana de biofilms maduros de manera estadísticamente significativa hasta en una unidad logarítmica ($P \leq 0.05$), en comparación con biofilms no tratados. Esto nos permite especular sobre una probable acción contra biofilms en menor tiempo de LFquimera, con respecto a la acción contra biofilms por parte de bLF.

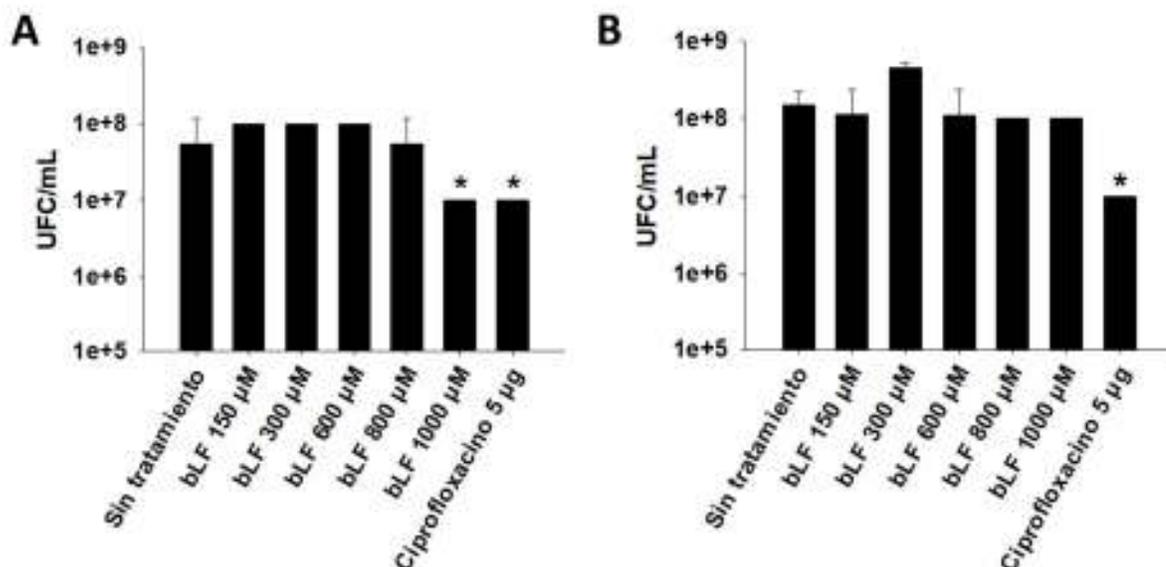


Figura 8. Lactoferrina bovina destruye biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en superficie, después de 8 y 12 h de tratamiento. *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) se inocularon en placa de 96 pocillos. La placa se incubó durante 24 h a una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se lavó y se aplicaron tratamientos de bLF (150, 300, 600, 800 y 1000 μM), y ciprofloxacino (5 μg), que se usó como control de inhibición de crecimiento. Como control de crecimiento se tomaron en cuenta los biofilms sin tratar. La placa se incubó durante 8 (panel A) ó 12 (panel B) h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO_2 . Al finalizar, las muestras se procesaron para cuantificar la biomasa del biofilm en las muestras, por determinación de UFC/mL, como previamente se describió. Las gráficas representan la media y desviación estándar en UFC/mL de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Los asteriscos indican significancia estadística $P \leq 0.05$.

3 Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera destruyen biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en células Caco-2

El resultado de los ensayos de destrucción de biofilms sobre superficie inerte nos permitió determinar concentraciones y tiempos de incubación a utilizar sobre biofilms maduros establecidos en células Caco-2. Adicionalmente, tanto bLF como LFquimera tuvieron acción sobre los biofilms, pero a diferentes concentraciones y en diferentes tiempos. Basado en estos resultados, realizamos un experimento para corroborar dichos datos.

Los resultados del presente ensayo coinciden con los anteriormente obtenidos (Figuras 6, 7 y 8), donde bLF 1000 μM (a partir de las 8 h de incubación) y LFquimera 10 μM (en el ensayo de 6 h); destruyeron significativamente biofilms maduros de *S. Typhimurium* establecidos en Caco-2, en comparación con los biofilms no tratados, disminuyendo hasta en más de un logaritmo la densidad bacteriana (Figura 9).

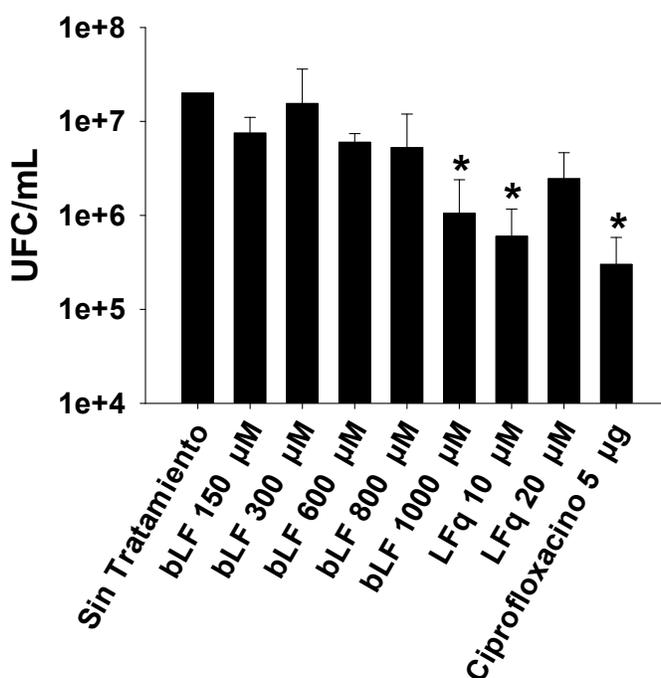


Figura 9. Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera destruyen biofilms maduros de *Salmonella* Typhimurium establecidos en células Caco-2. *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) se inocularon en placa con 1×10^4 de células Caco-2 en medio DMEM sin antibióticos. La placa se incubó durante 24 h a una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, la placa se lavó y se aplicaron tratamientos de bLF (150, 300, 600, 800 y 1000 μM), LFquimera (10 y 20 μM) y ciprofloxacino (5 μg), el cual se utilizó como control de inhibición de crecimiento. Como control de crecimiento se tomaron en cuenta los biofilms sin tratar. La placa se incubó durante 8 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO_2 . Al finalizar, las muestras se procesaron para cuantificar la biomasa del biofilm en las muestras por conteo de UFC/mL, como previamente se describió. Las gráficas representan la media y desviación estándar en UFC/mL de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Los asteriscos indican significancia estadística $P \leq 0.05$.

El efecto de bLF y LFquimera sobre los biofilms maduros de *S. Typhimurium* en Caco-2 fue visualizado mediante Microscopía de campo claro (Figura 10). Las imágenes demuestran que bLF 1000 μM y LFquimera 10 μM (Figura 10, paneles inferiores) presentan actividad biofilmicida en comparación al control sin tratamiento, en donde se observa una gran densidad de bacterias de *S. Typhimurium* agrupada formando biofilms; así como otras dispersas (Figura 10, panel superior izquierdo). De igual forma, el tratamiento con ciprofloxacino 5 μg también muestra un efecto

biofilmicida en *S. Typhimurium*, ya que esta bacteria es susceptible a dicho antibiótico (Figura 10, panel superior derecho).

En el caso de bLF 1000 μM , el efecto coincide con experimentos anteriores. En los ensayos de inhibición de formación de biofilms, en presencia de bLF había una gran cantidad de bacterias en sobrenadante, sin embargo, inhibía la adherencia a las células y formación de biofilms.

De la misma manera, en la imagen se observa disminución en la formación de biofilms, sin embargo, siguen observándose gran cantidad de bacterias dispersas (Figura 10, panel inferior derecho). Por otro lado, LFquimera 10 μM , muestra mayor eliminación de biofilms y bacterias dispersas, lo cual indica que esta presenta efecto inhibitorio, posiblemente lítico en *S. Typhimurium* (Figura 10, panel inferior izquierdo). Los resultados en conjunto descritos nos indican que bLF y LFquimera previenen y destruyen biofilms de *S. Typhimurium* en superficies inertes y en células Caco-2.

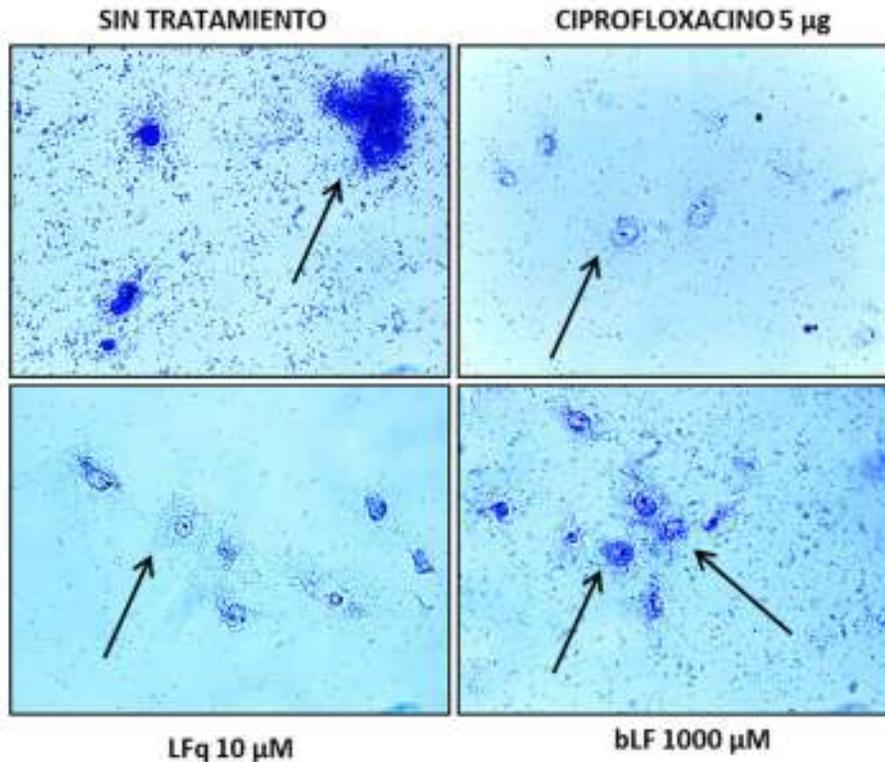


Figura 10. Lactoferrina bovina y lactoferrina quimera disgregan biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en células Caco-2. *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) se inocularon en placa de 8 pozos con 1×10^4 de células Caco-2 en medio DMEM. La placa se incubó durante 24 h a una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se lavó y se aplicaron tratamientos de bLF (1000 μM), LFquimera (10 μM) y ciprofloxacino (5 μg), que se usó como control de inhibición de crecimiento. Como control de crecimiento se tomaron en cuenta los biofilms sin tratar. La placa se incubó durante 8 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO_2 . Después, las muestras se lavaron y se fijaron con metanol al 70% durante 15 min, para posteriormente lavar y teñir con Giemsa durante 30 min. Al finalizar, las muestras se lavaron y procesaron para ser analizadas mediante microscopia de Luz. Las imágenes fueron tomadas en campo claro (40 X). Las fechas indican la presencia (Control sin tratar) o disgregación de biofilms (muestras tratadas).

C EFECTO SINÉRGICO DE LACTOFERINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA EN COMBINACIÓN CON ANTIBIOTICOS CONTRA BIOFILMS DE *Salmonella Typhimurium*

1 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *Salmonella Typhimurium*

La capacidad para formar biofilms por parte de una bacteria, aunado a la resistencia de antibióticos, las vuelve difíciles de tratar. Con el objetivo de analizar un posible efecto sinérgico entre bLF y LFquimera en combinación con antibióticos, primeramente, se realizó una prueba de sensibilidad a antibióticos por parte de *S. typhimurium*, con el fin de encontrar a cuál antibiótico es resistente esta bacteria.

Una vez realizado el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de *S. Typhimurium* a varios de los antibióticos prescritos para su tratamiento (mediante la prueba de difusión en disco), se encontró que *S. Typhimurium* presenta resistencia hacia gentamicina, ampicilina, sulfametoxazol, tetraciclina, ácido nalidíxico y hacia cloranfenicol. Mientras que, presentó sensibilidad hacia ceftazidima y mayormente hacia ciprofloxacino (Figura 11).

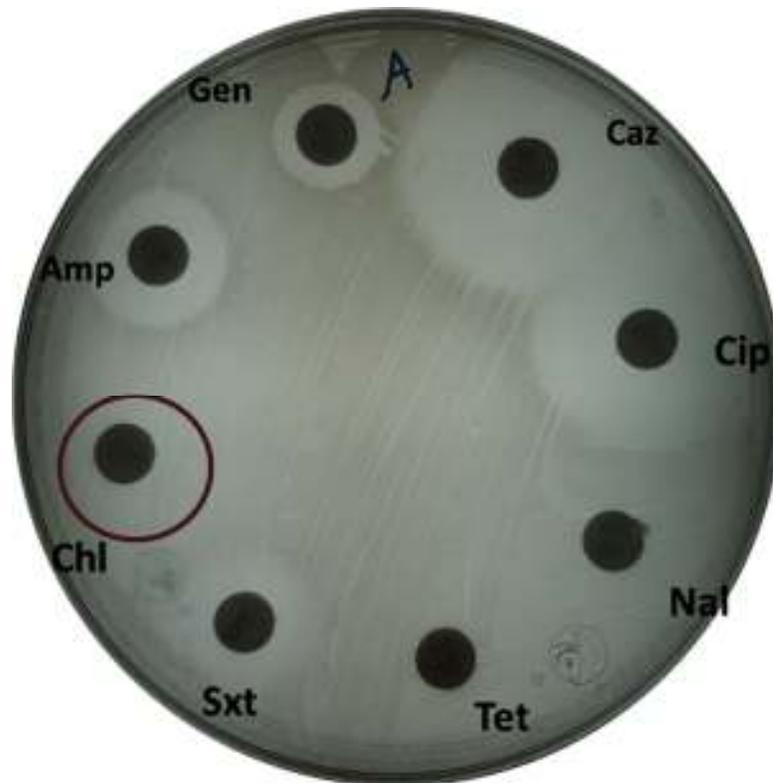


Figura 11. *Salmonella Typhimurium* es resistente a cloranfenicol y otros antibióticos.

S. Typhimurium (1×10^5 UFC/mL) se colocaron en placas de cultivos con medio MH Agar para posteriormente colocar los sensibilizadores impregnados con los antibióticos gentamicina (Gen); ampicilina (Amp); cloranfenicol (Chl); Sultametoxazol (Sxt); tetraciclina (Tet); ácido nalixídico (Nal); ciprofloxacino (Cip); y ceftazidima (Caz). Las placas se incubaron durante 24 h a 37 ° C y al finalizar se midió la longitud de los halos de inhibición de crecimiento de *S. Typhimurium* mediante un Vernier, y la sensibilidad fue clasificada como Resistente, Intermedio y Sensible de acuerdo al CLSI. Se observa resistencia al fármaco cloranfenicol (círculo rojo).

2 *Salmonella* Typhimurium presenta resistencia al antibiótico cloranfenicol

El anterior resultado mostró que *S. Typhimurium* presentaba resistencia a cloranfenicol mediante el método de difusión en agar y sensidiscos. El siguiente paso fue realizar un análisis más certero, a fin de establecer las concentraciones a las cuales *S. Typhimurium* presenta resistencia a cloranfenicol, se probaron distintas concentraciones de cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 y 40 µg/mL), de acuerdo al manual del CLSI.

De acuerdo con los resultados por el método de macrodilución, las concentraciones de 1, 8, 16, y 25 µg/mL; tuvieron efecto sobre el crecimiento de *S. Typhimurium* (Figura 12), tanto en la estimación del crecimiento bacteriano mediante absorbancia (Figura 12, panel A), como por el conteo de UFC/mL (Figura 12 panel B).

Sin embargo, a concentraciones de 32 y 40 µg de cloranfenicol, se observó una disminución significativa en el crecimiento de *S. Typhimurium* en las dos técnicas empleadas para determinar la resistencia a cloranfenicol (Figura 12, paneles A y B). Estos resultados nos permiten concluir que la cepa que estamos utilizando, la cual es un aislado clínico de un paciente con salmonelosis, es resistente a cloranfenicol.

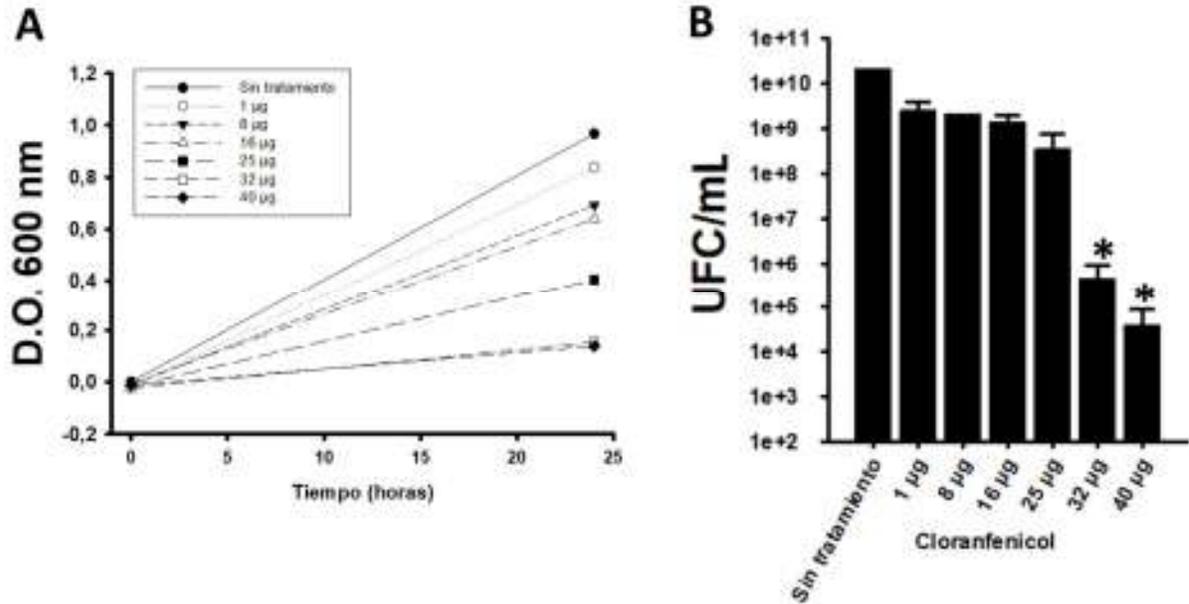


Figura 12. *Salmonella Typhimurium* en estado planctónico presenta resistencia a cloranfenicol. *S. Typhimurium* (1×10^5 UFC/mL) se inoculó en pocillos que contenían medio MH, para posteriormente adicionar el antibiótico cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 y 40 µg/mL). La placa se incubó durante 24 h a 37 °C. Después de esto, se determinó la absorbancia de las muestras (A), ó bien; se procesaron para realizar conteo de UFC/mL (B). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA, con respecto al control sin tratamiento y se muestra la media y desviación estándar en UFC/mL se una serie de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican una significancia estadística $P \leq 0.05$.

3 Los biofilms maduros de *Salmonella* Typhimurium establecidos en células Caco-2 son resistentes al antibiótico cloranfenicol.

En el anterior experimento quedo demostrado que el aislado clínico de *S. Typhimurium* utilizado en este estudio es resistente a cloranfenicol, de tal manera que el siguiente paso fue demostrar si esta resistencia también se presentaba en la cepa, cuando se encuentra formando biofilms maduros sobre células Caco-2.

En el experimento se probaron diferentes concentraciones de cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 y 40 $\mu\text{g/mL}$), de las cuales, a pesar de presentar disminución estadísticamente significativa con respecto al control sin tratamiento; estas concentraciones de cloranfenicol permitieron el crecimiento de *S. Typhimurium* (Figura 13, panel A), indicando que la cepa es resistente a este antibiótico.

Por otra parte, en la Figura 13, panel B, las imágenes muestran que durante el tratamiento con cloranfenicol las células presentan cierta cantidad de bacterias adheridas a las células Caco-2 pero también muchas dispersas, comparados con los biofilms presentes en las células Caco-2, que no recibieron tratamiento. Sin embargo, bajo el tratamiento de ciprofloxacino (5 μg), el crecimiento de los biofilms en las células disminuye considerablemente (Figura 13, panel B). Los resultados nos indican que *S. Typhimurium* es resistente a cloranfenicol cuando esta bacteria forma biofilms en células Caco-2.

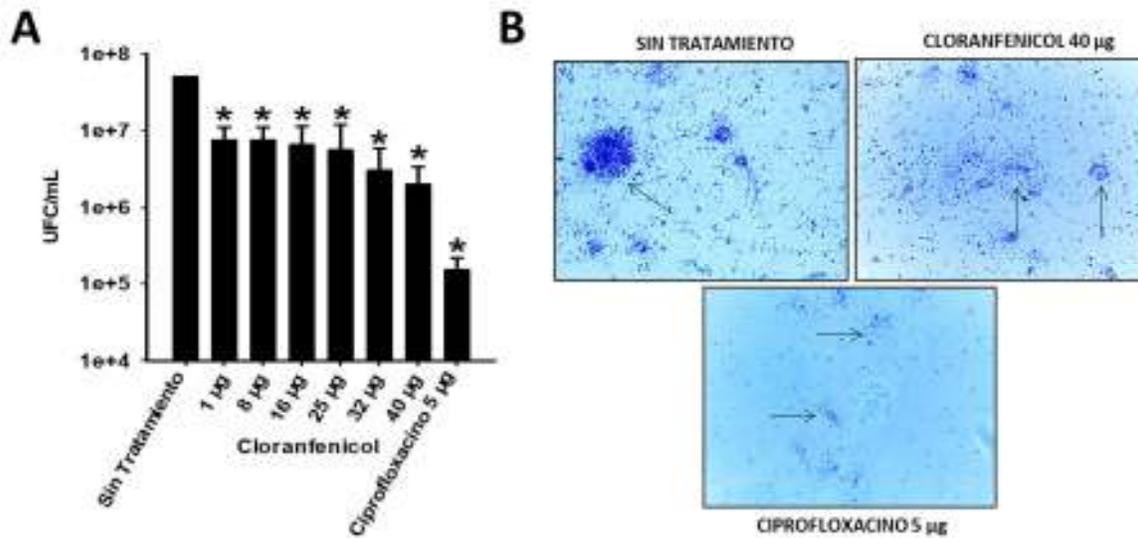


Figura 13. Biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en células Caco-2 son resistentes a cloranfenicol.

S. Typhimurium (1×10^5 UFC/mL) se inoculó en pocillos con 1×10^4 células Caco-2 en medio DMEM, para posteriormente adicionar el antibiótico cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La placa se incubó durante 24 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO_2 . Después de esto, se determinó el crecimiento bacteriano por conteo de UFC/mL (A), ó bien; las muestras se tiñeron con Giemsa y se procesaron para ser analizadas por microscopia de luz (B). En el caso del conteo de UFC/mL (A), los resultados fueron analizados mediante ANOVA, con respecto al control sin tratamiento y se muestra la media y desviación estándar en UFC/mL se una serie de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican una significancia estadística $P \leq 0.05$. Para el caso de biofilms teñidos con Giemsa (b), las imágenes fueron tomadas en campo claro (40 X). Las flechas indican la presencia (Control sin tratar) o disgregación de biofilms (muestras tratadas).

4 Lactoferrina bovina y cloranfenicol presentan acción sinérgica en biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en células Caco-2

En los anteriores experimentos se observó que *S. Typhimurium* en estado planctónico y estableciéndose sobre células Caco-2 como biofilms; es resistente al efecto del antibiótico cloranfenicol. Prosiguiendo con los análisis, nos dimos a la tarea de investigar si la bLF combinada con cloranfenicol tiene efecto sobre biofilms maduros de *S. Typhimurium* establecidos en células Caco-2.

En los resultados se aprecia que las combinaciones de bLF (300 μ M) más cloranfenicol (40 μ g) y bLF (150 μ M) más cloranfenicol (8 μ g) (Figura 14, paneles inferiores), podrían presentar efecto sinérgico en la disminución de los biofilms, comparados con las muestras que no recibieron tratamiento ó bien con otras combinaciones (Figura 14).

Sin embargo, al comparar la combinación con bLF (300 μ M) y cloranfenicol (40 μ g) no se observó efecto sinérgico (Figura 15 paneles A y B). Esto fue corroborado al aplicar la fórmula del Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI). El resultado fue 2.6, que corresponde a efecto indiferente. Al observar las imágenes, el tratamiento con cloranfenicol (40 μ g) muestra menor cantidad de bacterias adheridas a las células Caco-2, pero en menor medida por el efecto presentado por el antibiótico ciprofloxacino, que siguió mostrando efecto inhibitorio (Figura 15, panel B).

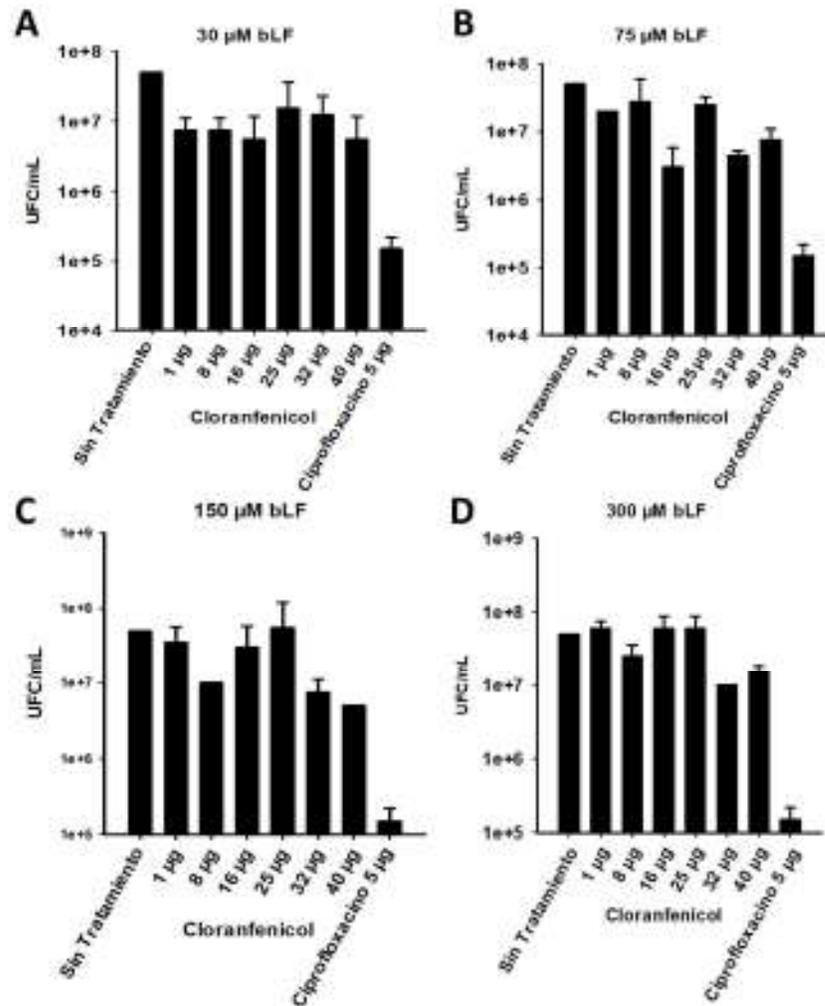


Figura 14. Lactoferrina bovina actúa en sinergismo con cloranfenicol contra biofilms de *Salmonella Typhimurium* establecidos en Caco-2.

S. Typhimurium (1×10^5 UFC/mL) se depositaron pocillos de una placa de 24 pocillos que contenía células Caco-2 en medio DMEM. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez establecidos los biofilms maduros, se añadió DMEM en los pocillos más los siguientes tratamientos: bLF (30, 75, 150 ó 300 µM) cada concentración combinada con cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 ó 40 µg), ó bien; LFquimera (1, 2, 5 ó 10 µM) en combinación con cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 ó 40 µg). Como control de inhibición del crecimiento se utilizó ciprofloxacino (5 µg) y como control de crecimiento óptimo se tomaron en cuenta el crecimiento de los biofilms sin tratar. La placa se incubó durante 8 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Después, las muestras se lavaron con PBS y se desprendió el fondo para desprender los biofilms y posteriormente las muestras se procesaron para determinar UFC/mL en cada tratamiento y controles. Los datos fueron analizados mediante ANOVA, comparando cada tratamiento contra el control sin tratamiento. Los resultados muestran la media y desviación estándar de una serie de tres experimentos expresados en UFC/mL. Los asteriscos indican significancia estadística $P \leq 0.05$.

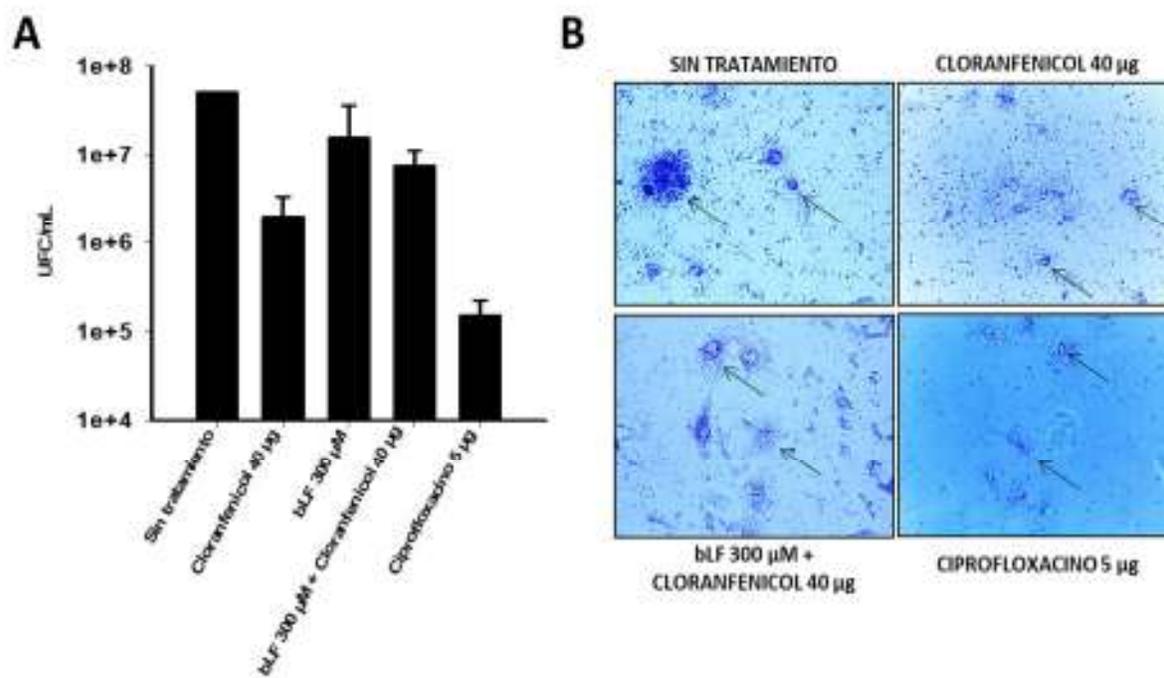


Figura 15. Lactoferrina bovina presenta efecto sinérgico en combinación con cloranfenicol en biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en Caco-2.

S. Typhimurium (1×10^5 UFC/mL) se depositaron pocillos de una placa de 24 pocillos que contenía células Caco-2 en medio DMEM. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez establecidos los biofilms maduros, se añadió DMEM en los pocillos más los siguientes tratamientos: bLF (300 µM) combinada con cloranfenicol (40 µg). Como control de inhibición del crecimiento se utilizó ciprofloxacino (5 µg) y como control de crecimiento óptimo se tomaron en cuenta el crecimiento de los biofilms sin tratar. La placa se incubó durante 8 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Después, las muestras se procesaron para determinar UFC/mL en cada tratamiento y controles (A), ó para observar el efecto de los tratamientos en biofilms sobre las células por microscopía de luz (B). Los datos fueron analizados mediante ANOVA, comparando cada tratamiento contra el control sin tratamiento. Los resultados muestran la media y desviación estándar de una serie de tres experimentos expresados en UFC/mL. Los asteriscos indican significancia estadística $P \leq 0.05$. Para el caso del análisis por microscopio las muestras se analizaron con el objetivo 40 X.

5 Lactoferrina quimera y cloranfenicol presentan acción sinérgica en biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en células Caco-2

El efecto sinérgico entre LFquimera en combinación con el antibiótico cloranfenicol también se estudió. En los resultados se aprecia que las combinaciones de LFquimera (10 μ M) más cloranfenicol (1 μ g) (Figura 16, panel inferior derecho), presenta efecto sinérgico en los biofilms, comparados con las muestras que no recibieron tratamiento ó bien con otras combinaciones (Figura 16).

Al analizar el efecto de LFquimera (10 μ M), cloranfenicol (1 μ g), y el resultado de la combinación de LFquimera (10 μ M) más cloranfenicol (1 μ g); se observa efecto sinérgico (Figura 17, paneles A y B). Esto fue corroborado al aplicar la fórmula del Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI). El resultado fue 0.31, que corresponde a efecto sinérgico. Por otro lado, al observar las imágenes; el tratamiento de LFquimera (10 μ M) más cloranfenicol (1 μ g) muestra menor cantidad de bacterias adheridas a las células Caco-2, así como dispersas, en comparación con el control de biofilms maduros sin tratar. El antibiótico ciprofloxacino sigue mostrando efecto inhibitorio (Figura 17).

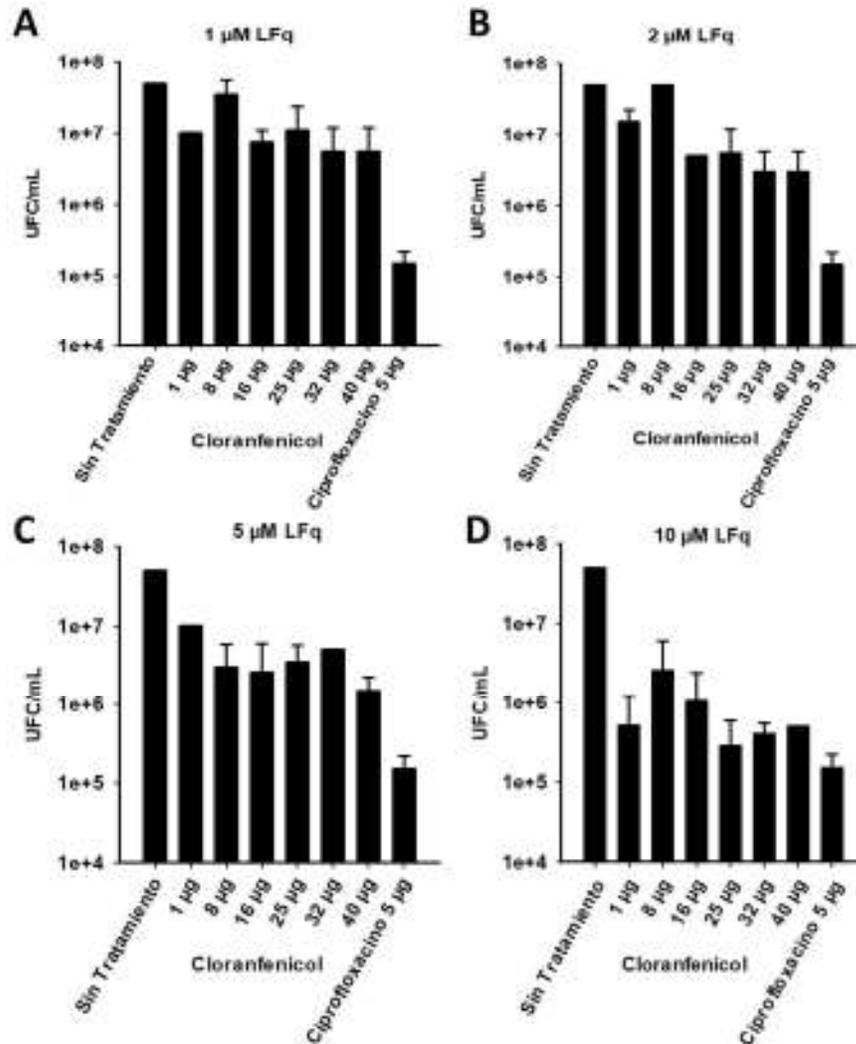


Figura 16. Lactoferrina quimera y cloranfenicol presentan efecto sinérgico contra biofilms maduros de *Salmonella Typhimurium* establecidos en células Caco-2.

S. Typhimurium (1×10^5 UFC/mL) se depositaron pocillos de una placa de 24 pocillos que contenía células Caco-2 en medio DMEM. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez establecidos los biofilms maduros, se añadió DMEM en los pocillos más los siguientes tratamientos: LFquimera (1, 2, 5 ó 10 μM) en combinación con cloranfenicol (1, 8, 16, 25, 32 ó 40 μg). Como control de inhibición del crecimiento se utilizó ciprofloxacino (5 μg) y como control de crecimiento óptimo se tomaron en cuenta el crecimiento de los biofilms sin tratar. La placa se incubó durante 8 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Después, las muestras se lavaron con PBS y se desprendió el fondo para desprender los biofilms y posteriormente las muestras se procesaron para determinar UFC/mL en cada tratamiento y controles. Los datos fueron analizados mediante ANOVA, comparando cada tratamiento contra el control sin tratamiento. Los resultados muestran la media y desviación estándar de una serie de tres experimentos expresados en UFC/mL. Los asteriscos indican significancia estadística $P \leq 0.05$.

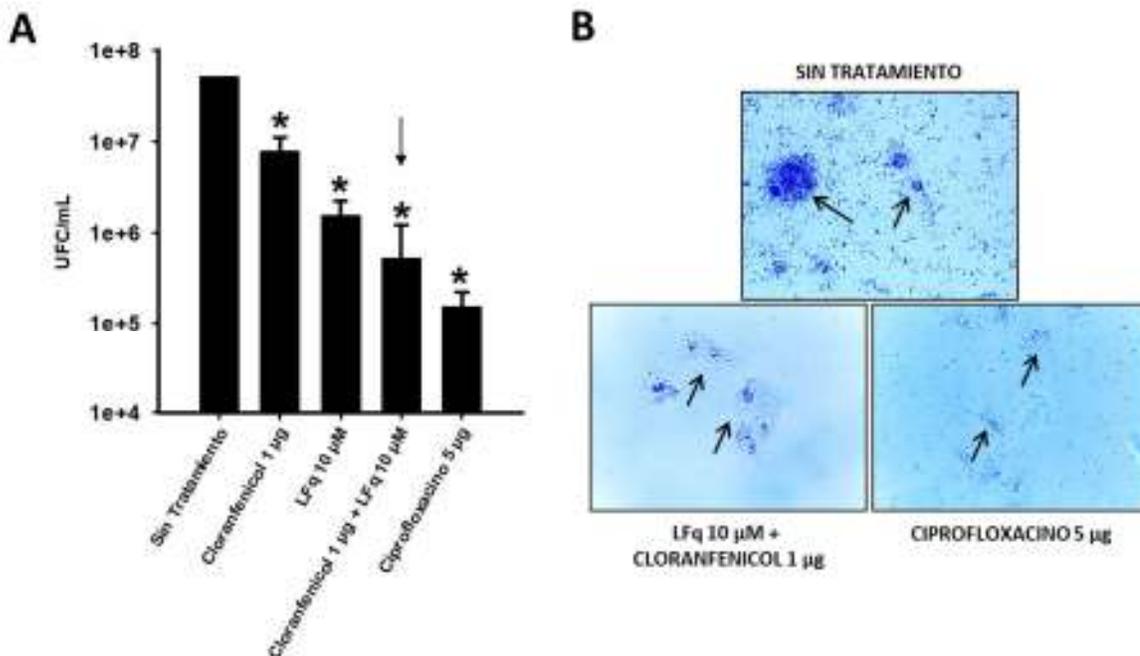


Figura 17. Lactoferrina quimera presenta efecto sinérgico en combinación con cloranfenicol en biofilms maduros de *Salmonella* Typhimurium establecidos en células Caco-2.

S. Typhimurium (1×10^5 UFC/mL) se depositaron pocillos de una placa de 24 pocillos que contenía células Caco-2 en medio DMEM. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez establecidos los biofilms maduros, se añadió DMEM en los pocillos más los siguientes tratamientos: LFquimera (10 µM) combinada con cloranfenicol (1 µg). Como control de inhibición del crecimiento se utilizó ciprofloxacino (5 µg) y como control de crecimiento óptimo se tomaron en cuenta el crecimiento de los biofilms sin tratar. La placa se incubó durante 8 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO₂. Después, las muestras se procesaron para determinar UFC/mL en cada tratamiento y controles (A), ó para observar el efecto de los tratamientos en biofilms sobre las células por microscopía de luz (B). La flecha indica el tratamiento que presentó efecto sinérgico de acuerdo a FICI. Los datos fueron analizados mediante ANOVA, comparando cada tratamiento contra el control sin tratamiento. Los resultados muestran la media y desviación estándar de una serie de tres experimentos expresados en UFC/mL. Los asteriscos indican significancia estadística $P \leq 0.05$. Para el caso del análisis por microscopio las muestras se analizaron con el objetivo 40 X.

X DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis, encontramos que la proteína bLF y LFquimera previenen la formación de biofilms y destruyen biofilms establecidos por la bacteria *Salmonella* Typhimurium sobre células Caco-2. Además, tanto LFquimera presentaron efecto sinérgico contra *Salmonella* (en estado planctónico ó formando biofilms) cuando se combinaron con cloranfenicol, *in vitro*.

Las enfermedades infecciosas causadas por patógenos bacterianos como *Salmonella* spp. han incrementado alarmantemente, mientras que el desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido. La principal causa es la adquisición de resistencia a los antibióticos por parte de bacterias patógenas, lo cual hace cada vez más difícil encontrar tratamientos eficaces. En especial *Salmonella* Typhimurium, una bacteria causante de salmonelosis y fiebre entérica (tifoidea), ha adquirido resistencia contra antibióticos como tetraciclina, ampicilina cefotaxima, ceftazidima, sulfametoxazol, ácido nalidíxico, cloranfenicol y gentamicina. Además; presenta capacidad para formar biofilms, colonizando superficies tales como intestino de animales domésticos, plantas, así como superficies abióticas, lo cual incrementa la incidencia de infecciones adquiridas a través de los alimentos. Incluso, tratamientos de desinfección de superficies contaminadas por biofilms en la industria alimenticia han fallado en la eliminación de biofilms maduros de *S. Typhimurium* (Hermans et al. 2011; Corcoran et al. 2014). Por todo esto; la búsqueda de alternativas para el combate de infecciones de *Salmonella* es fundamental, y propusimos el probar la capacidad de bLF y LFquimera contra *S. Typhimurium* por tener propiedades antimicrobianas bien demostradas. Tal es el caso de que bLF y sus péptidos derivados han mostrado actividad antimicrobiana, contra una gran variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluso bacterias multi-fármaco-resistentes (Oho et al. 2002; Velusamy et al. 2016; Singh et al. 2002).

La capacidad de bLF para inhibir la adherencia y formación de biofilms ya había sido previamente reportada en biofilms de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) sobre células Hep-2 (Mosquito et al. 2010) y en la formación de biofilms por *P. aeruginosa*, observando un efecto dependiente de la concentración, lo que sugiere que existe una concentración óptima de bLF para inhibir la formación de biofilms (Kamiya et al. 2012). Con respecto a LFquimera, se ha reportado que presenta mayor actividad inhibitoria de biofilms comparada contra sus dos péptidos constitutivos (LFcina17-30 y LFampina265-284). Su efecto fue observado en patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* (Ruangcharoen et al. 2017), y también en células planctónicas y formando biofilms por parte de *S. pneumoniae* (Leon-Sicairos et al. 2014).

En este estudio, observamos que bLF y LFquimera inhibieron el crecimiento y formación de biofilms de *S. Typhimurium* primeramente en estado planctónico (Figura 3), previo al proceso de adherencia y formación de biofilms (Figuras 4 y 5), y también presentaron actividad anti-biofilm en biofilms maduros establecidos sobre superficie y sobre células Caco-2 (Figuras 7, 8, 9 y 10). De acuerdo con los resultados obtenidos, bLF tuvo efecto antibacteriano sobre células de *S. Typhimurium* (en estado planctónico) cuando estos se trataron durante 6 h con concentraciones de 75, 150, 300, 800 y 1000 μM (Figura 3, panel A), mientras que LFquimera tuvo su efecto a concentraciones de 10 y 20 μM (Figura 3, panel B). Estas concentraciones son mayores que las que se utilizaron para inhibir el crecimiento de *Salmonella enterica* ATCC 14028, en un trabajo previo al nuestro. En dicho trabajo las concentraciones de bLF usadas para inhibir el crecimiento de *Salmonella* fueron de 20 y 40 μM , mientras que para LFquimera fueron de 5 y 10 μM (Angulo-Zamudio et al 2019, manuscrito bajo revisión, *Frontiers in Microbiology*). A este respecto, nosotros especulamos que fue necesaria una concentración mayor de bLF y LFquimera para inhibir el

crecimiento del aislado clínico usado en este trabajo porque pudiera ser que como aislado clínico resistente a antibióticos, esta cepa de *S. Typhimurium* puede tener un mecanismo genético que proporciona una ventaja frente a los antimicrobianos y directamente a la virulencia y al fitness bacteriano, como son; cambios en la estructura de la pared celular, bombas de expulsión, porinas ó sistemas reguladores de dos componentes, ya que como bien se sabe, la presión antibiótica en los aislados clínicos fomenta la dispersión de plásmidos con marcadores de resistencia y a menudo también de virulencia (Krasinski 1987; Stephenson and Hoch 2002). Todo ello las hace más resistentes a cualquier opción terapéutica donde se podrían incluir también componentes de la respuesta inmune innata como la bLF y por ende también sus péptidos, para este caso a la LFquimera, razón por cual se necesitaron concentraciones más altas de estos para inhibir el crecimiento bacteriano de esta bacteria comparado con la cepa ATCC utilizada por Angulo-Zamudio (2019).

Con respecto a que bLF inhibe la formación de biofilms a las 6 h de tratamiento (Figura 4), dicho efecto inhibitorio podría ser bacteriostático, ya que al realizar los experimentos fue posible observar mayor cantidad de bacterias en sobrenadante (Figura 4, panel A), comparado con las bacterias encontradas en el biofilm (Figura 4, panel B). Adicionalmente, este efecto que especulamos es bacteriostático, también podría ser en parte un efecto de inhibición en la adhesión de las bacterias a la célula blanco (por impedimento esférico), tal y como se ha reportado en otros trabajos, por ejemplo la inhibición de *Escherichia coli* enteropatógena a células HeLa (de Araujo and Giugliano 2001), ó la inhibición de la adhesión de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia* a fibroblastos y células epiteliales (Alugupalli and Kalfas 1995).

En contraste, LFquimera (Figura 5) si presenta actividad bactericida ya que inhibe la densidad bacteriana en el biofilm (Figura 5, panel b), y con ello, evita la formación de biofilms así como su presencia en sobrenadante (Figura 5 panel A) en comparación al control sin tratar. Estos resultados coinciden con Xu et al. (2010), quienes en su estudio obtuvieron que LF, LFcina17-30, LFampina268-284, LFcina mas LFampina y LFquimera (fusión LFcina17-30 y LFampina268-284) son candidatos potenciales para combatir a *P. aeruginosa* y la formación de biofilms por estas bacterias. En dicho estudio, también se observó que el péptido LFquimera presentó un efecto más efectivo que el resto de los péptidos analizados y también comparado con la proteína nativa (Xu et al. 2010). De igual forma, nuestro grupo de trabajo, previamente había reportado que LFquimera inhibe la adherencia de *E. coli* EPEC a células Hep-2, incluso en mayor grado que sus péptidos constitutivos, LFcina17-30 y LFampina265-284 (Flores-Villasenor et al. 2012).

En cuanto a los tiempos, se encontró que a las 6 h de tratamiento bLF y LFquimera inhibieron significativamente la formación de biofilms (Figura 4 y 5), mientras que a las 6 h de tratamiento sobre biofilms maduros, solo LFquimera 10 μ M disminuyó la densidad bacteriana de manera significativa, comparado con el control sin tratar (Figura 7). Por su parte, bLF solo mostró efecto anti-biofilm a partir de las 8 h de incubación a una concentración mayor de 1000 μ M (Figura 8 y 9), perdiendo este efecto a las 12 h, coincidiendo con lo encontrado por Kamiya et al. (2012), donde el efecto de bLF aumentaba con la concentración, pero en cierto punto, este efecto disminuía. De manera general, al comparar el efecto en biofilms maduros con el ensayo de formación de biofilms, la actividad de bLF y LFquimera para disminuir densidad bacteriana de biofilms maduros se ve disminuida. Suponemos que en un sistema de experimentación más complejo como es el modelo de biofilms de *S. Typhimurium* sobre células Caco-2, existen una infinidad de moléculas con las cuales bLF puede interactuar, ya que por su punto isoelectrico alto (≥ 9) es capaz de unirse a pseudo-

receptores localizados en las células Caco-2, y porque también; su carga neta positiva, le permite interactuar con los componentes de naturaleza negativa localizados principalmente en las bacterias y componentes del biofilm (Alexander et al. 2012; Baker and Baker 2005, 2009), de tal manera que en el modelo de biofilm sobre superficie inerte ó en un modelo de prevención de adhesión ó formación de biofilms, el efecto de bLF y será más efectivo. Es importante remarcar que la actividad de bLF y LFquimera en biofilms maduros de *S. Typhimurium* no ha sido reportada anteriormente.

Siguiendo los resultados de este trabajo, se observó que el establecimiento de biofilms maduros brinda resistencia hacia antibióticos a los cuales *S. Typhimurium* era sensible en su forma planctónica y durante el proceso inicial de formación de biofilm (como ciprofloxacino, Figuras 4 y 5), lo cual en práctica clínica probablemente dificulta el tratamiento de estas infecciones. En este sentido, proteínas y péptidos antimicrobianos como LF, debido a su principal mecanismo de acción basado en irrumpir y desestabilizar la integridad de la membrana bacteriana, hace que el generar resistencia hacia ella por parte de las bacterias sea un fenómeno bastante raro e inclusive inexistente. Además, debido a modo de acción facilitan la entrada y la acción de los antibióticos a las bacterias (Rivas-Santiago et al. 2006). Esto llevó a realizar ensayos de sinergismo entre bLF y LFquimera con cloranfenicol, un fármaco al cual *S. Typhimurium* presenta resistencia. Al realizar el ensayo de resistencia antimicrobiana, también se encontró resistencia hacia gentamicina, ampicilina, sulfametoxazol, ácido nalidixico y tetraciclina, por lo cual el aislado clínico de *S. Typhimurium* usado en el presente trabajo, es multi-fármaco-resistente.

El ensayo de interacción donde se combinó el efecto de bLF y cloranfenicol ó bien LFquimera mas cloranfenicol mostró que las combinaciones bLF 300 μ M + 40 μ g cloranfenicol, bLF 150 μ M + 8 μ g cloranfenicol y LFquimera 10 μ M + 1 μ g cloranfenicol; presentaron mayor efecto en

combinación. Sin embargo, solo LFquimera 10 μ M + 1 μ g cloranfenicol presentaron efecto sinérgico a las 8 h de incubación de acuerdo con la determinación de FICI. El efecto sinérgico entre bLF ó péptidos como LFquimera con antibióticos como cloranfenicol, conlleva a aumentar la capacidad del antibiótico y la efectividad de manera general para eliminar bacterias como *S. Typhimurium* y biofilms establecidos. Estos resultados coinciden con otro estudio donde se reportó la capacidad de bLF para reducir la concentración mínima bactericida (MBC) y concentración mínima inhibitoria (MIC) de vancomicina para biofilms de *Staphylococcus epidermidis*, patógeno relacionado a infecciones causantes de endoftalmitis por uso de lentes intraoculares (Leitch and D Willcox 1999).

En conclusión, este estudio muestra que bLF y LFquimera tienen potencial para combatir biofilms pre-formados y formados de bacterias como *S. Typhimurium*. Además, aumentan la sensibilidad de esta bacteria hacia antibióticos a los cuales presentan resistencia, como fue el caso del cloranfenicol, facilitando su entrada y acción mediante sinergismo, lo cual es una opción a futuro para realizar estudios posteriores y proponerlos como nuevos agentes con capacidad para combatir la creciente resistencia de patógenos hacia antibióticos convencionales.

XI CONCLUSIONES

- bLF y el péptido LFquimera presentaron efecto bactericida en el aislado clínico de *S. Typhimurium* en estado planctónico.
- bLF y LFquimera evitaron la adhesión y formación de biofilms por parte de *S. Typhimurium* en células Caco-2.
- bLF y LFquimera presentan efecto biofilmicida en biofilms maduros de *S. Typhimurium* establecidos en células Caco-2.
- bLF en combinación con cloranfenicol, no presentó efecto sinérgico biofilms maduros de *S. Typhimurium* establecidos en células Caco-2.
- LFquimera presentó efecto sinérgico en combinación con cloranfenicol en biofilms maduros de *S. Typhimurium* establecidos en células Caco-2.

XII BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Smith E, Viveros-Jimenez K, Canizalez-Roman A, Reyes-Lopez M, Bolscher JGM, Nazmi K, Flores-Villasenor H, Alapizco-Castro G, de la Garza M, Martinez-Garcia JJ, Velazquez-Roman J, Leon-Sicaireos N (2017) Bovine Lactoferrin and Lactoferrin-Derived Peptides Inhibit the Growth of *Vibrio cholerae* and Other *Vibrio* species. *Frontiers in microbiology* 8:2633. doi:10.3389/fmicb.2017.02633
- Acuna Soto R, Stahle DW, Therrell MD, Griffin RD, Cleaveland MK (2006) When half of the population died: the epidemic of hemorrhagic fevers of 1576 in Mexico. *FEMS microbiology letters*. doi:https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.011
- Aguila A, Herrera AG, Morrison D, Cosgrove B, Perojo A, Montesinos I, Perez J, Sierra G, Gemmell CG, Brock JH (2001) Bacteriostatic activity of human lactoferrin against *Staphylococcus aureus* is a function of its iron-binding properties and is not influenced by antibiotic resistance. *FEMS immunology and medical microbiology* 31 (2):145-152
- Aisen P, Leibman A (1972) Lactoferrin and transferrin: a comparative study.
- Alexander DB, Iigo M, Yamauchi K, Suzui M, Tsuda H (2012) Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 90 (3):279-306. doi:10.1139/o2012-013
- Alugupalli KR, Kalfas S (1995) Inhibitory effect of lactoferrin on the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia* to fibroblasts and epithelial cells. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 103 (2):154-160
- Amrutha B, Sundar K, Shetty PH (2017) Study on *E. coli* and *Salmonella* biofilms from fresh fruits and vegetables. *Journal of food science and technology* 54 (5):1091-1097. doi:10.1007/s13197-017-2555-2
- Angkititrakul S, Chomvarin C, Chaita T, Kanistanon K, Waethewutajarn S (2005) Epidemiology of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from pork, chicken meat and humans in Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 36 (6):1510-1515
- Arcangioli MA, Leroy-Setrin S, Martel JL, Chaslus-Dancla E (2000) Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella Typhimurium* strains implicates definitive phage type (DT) 104. *Journal of medical microbiology* 49 (1):103-110. doi:10.1099/0022-1317-49-1-103
- Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ (1980) Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and immunity* 28 (3):893-898
- Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, Gauthier JJ (1982) Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infection and immunity* 35 (3):792-799
- Asai T, Sato C, Masani K, Usui M, Ozawa M, Ogino T, Aoki H, Sawada T, Izumiya H, Watanabe H (2010) Epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance in salmonella enterica serovar typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. *Gut pathogens* 2 (1):17. doi:10.1186/1757-4749-2-17
- Bager F, Helmuth R (2001) Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. *Veterinary research* 32 (3-4):285-290. doi:10.1186/s13567-014-0080-0
- Baker EN, Anderson BF, Baker HM, Haridas M, Jameson GB, Norris GE, Rumball SV, Smith CA (1991) Structure, function and flexibility of human lactoferrin. *International journal of biological macromolecules* 13 (3):122-129. doi:0141-8130(91)90036-T [pii]
- Baker EN, Baker HM (2005) Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (22):2531-2539. doi:10.1007/s00018-005-5368-9
- Baker EN, Baker HM (2009) A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie* 91 (1):3-10. doi:10.1016/j.biochi.2008.05.006
- Barreto Arce LJ, Contreras García CA, Durand Vara D, Ochoa Woodell T (2016) Lactoferrina bovina disminuye la invasión de *Salmonella enterica* en células HEp-2. *Revista de Gastroenterología del Perú* 36:304-307
- Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M (1992) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol* 73 (6):472-479
- Besser JM (2018) *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food microbiology* 71:55-59. doi:10.1016/j.fm.2017.08.018
- Betancor L, Pereira M, Martinez A, Giossa G, Fookes M, Flores K, Barrios P, Repiso V, Vignoli R, Cordeiro N, Algorta G, Thomson N, Maskell D, Schelotto F, Chabalgoity JA (2010) Prevalence of *Salmonella enterica* in poultry and

- eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of clinical microbiology* 48 (7):2413-2423. doi:10.1128/JCM.02137-09
- Betancor L, Schelotto F, Fernandez M, Pereira M, Rial A, Chabalgoity JA (2005) An attenuated *Salmonella Enteritidis* strain derivative of the main genotype circulating in Uruguay is an effective vaccine for chickens. *Veterinary microbiology* 107 (1-2):81-89. doi:10.1016/j.vetmic.2005.01.004
- Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodriguez MA, Vignoli R, Chabalgoity JA (2004) Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *Journal of clinical microbiology* 42 (3):1155-1162. doi:10.1128/jcm.42.3.1155-1162.2004
- Bhatia RK, Pallister I, Dent C, Jones SA, Topley N (2005) Enhanced neutrophil migratory activity following major blunt trauma. *Injury* 36 (8):956-962. doi:10.1016/j.injury.2005.03.009
- Biendo M, Thomas D, Dechepy O, Laurans G, Eb F (2003) Molecular epidemiology of ampicillin-resistant clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International journal of medical microbiology : IJMM* 293 (2-3):219-223. doi:10.1078/1438-4221-00255
- Bolscher JG (2007) Chimerization of the two bovine lactoferrin peptides, lactoferricin and lactoferrampin, strongly potentiates their antimicrobial activity: biological and biophysical implications. VIII Conference on Lactoferrin: Structure, Functions and Applications Nice, France (1):32
- Bolscher JG, Adao R, Nazmi K, van den Keybus PA, van 't Hof W, Nieuw Amerongen AV, Bastos M, Veerman EC (2009a) Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. *Biochimie* 91 (1):123-132. doi:S0300-9084(08)00187-9 [pii] 10.1016/j.biochi.2008.05.019
- Bolscher JG, van der Kraan MI, Nazmi K, Kalay H, Grun CH, Van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV (2006) A one-enzyme strategy to release an antimicrobial peptide from the LFampin-domain of bovine lactoferrin. *Peptides* 27 (1):1-9. doi:S0196-9781(05)00308-6 [pii] 10.1016/j.peptides.2005.06.012
- Bolscher JGM, Adão R, Nazmi K, van den Keybus PAM, van 't Hof W, Nieuw Amerongen AV, Bastos M, Veerman ECI (2009b) Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. *Biochimie* 91 (1):123-132. doi:https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.019
- Branchu P, Bawn M, Kingsley RA (2018) Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella* Typhimurium pathovariants. *Infection and immunity*. doi:10.1128/IAI.00079-18
- Brock JH (2002) The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 80 (1):1-6
- Brock JH (2012) Lactoferrin--50 years on. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 90 (3):245-251. doi:10.1139/o2012-018
- Bush K (2018) Game Changers: New beta-Lactamase Inhibitor Combinations Targeting Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *ACS infectious diseases* 4 (2):84-87. doi:10.1021/acsinfecdis.7b00243
- Bythwood TN, Soni V, Lyons K, Hurley-Bacon A, Lee MD, Hofacre C, Sanchez S, Maurer JJ (2019) Antimicrobial Resistant *Salmonella enterica* Typhimurium Colonizing Chickens: The Impact of Plasmids, Genotype, Bacterial Communities, and Antibiotic Administration on Resistance. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 3 (20). doi:10.3389/fsufs.2019.00020
- Corcoran M, Morris D, De Lappe N, O'Connor J, Lalor P, Dockery P, Cormican M (2014) Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and environmental microbiology* 80 (4):1507-1514. doi:10.1128/AEM.03109-13
- Costerton JW (1995) Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15 (3):137-140
- Chapple DS, Joannou CL, Mason DJ, Shergill JK, Odell EW, Gant V, Evans RW (1998) A helical region on human lactoferrin. Its role in antibacterial pathogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* 443:215-220
- Chen PL, Li CY, Hsieh TH, Chang CM, Lee HC, Lee NY, Wu CJ, Lee CC, Shih HI, Ko WC (2012) Epidemiology, disease spectrum and economic burden of non-typhoidal *Salmonella* infections in Taiwan, 2006-2008. *Epidemiology and infection* 140 (12):2256-2263. doi:10.1017/S0950268812000088
- D VTN, Venkitanarayanan K, Kollanoor Johny A (2018) Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods* 7 (10). doi:10.3390/foods7100167
- de Araujo AN, Giugliano LG (2001) Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC microbiology* 1:25
- Delgado Ronda N, Munoz Bellido JL, Garcia Garcia MI, Ibanez Perez R, Munoz Criado S, Serrano Heranz R, Saenz Gonzalez MC, Garcia Rodriguez JA (2006) Molecular epidemiology of drug-resistant *Salmonella* Typhimurium

- in Spain. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia* 19 (2):152-160
- Desgrandchamps D (1992) [Antibiotics 1992: mechanism of resistance and its clinical relevance]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 122 (8):247-256
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* 8 (9):881-890. doi:10.3201/eid0809.020063
- Drago-Serrano ME, Campos-Rodríguez R, Carrero JC, de la Garza M (2017) Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections. *International journal of molecular sciences* 18 (3):501. doi:10.3390/ijms18030501
- Dunne WM, Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews* 15 (2):155-166
- Eichenholz PW, Eichacker PQ, Hoffman WD, Banks SM, Parrillo JE, Danner RL, Natanson C (1992) Tumor necrosis factor challenges in canines: patterns of cardiovascular dysfunction. *The American journal of physiology* 263 (3 Pt 2):H668-675. doi:10.1152/ajpheart.1992.263.3.H668
- Embleton ND, Berrington JE, McGuire W, Stewart CJ, Cummings SP (2013) Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. doi:10.1016/j.siny.2013.02.001
- Ewing WH (1972) The nomenclature of *Salmonella*, its usage, and definitions for the three species. *Canadian journal of microbiology* 18 (11):1629-1637
- Farnaud S, Evans RW (2003) Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular immunology* 40 (7):395-405. doi:S0161589003001524 [pii]
- Flores-Villasenor H, Canizalez-Roman A, de la Garza M, Nazmi K, Bolscher JG, Leon-Sicairos N (2012) Lactoferrin and lactoferrin chimera inhibit damage caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in HEp-2 cells. *Biochimie* 94 (9):1935-1942. doi:10.1016/j.biochi.2012.05.011
- Flores-Villasenor H, Canizalez-Roman A, Reyes-Lopez M, Nazmi K, de la Garza M, Zazueta-Beltran J, Leon-Sicairos N, Bolscher JG (2010) Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFCin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals* 23 (3):569-578. doi:10.1007/s10534-010-9306-4
- Flores-Villaseñor H, Canizalez-Román A, Reyes-Lopez M, Nazmi K, de la Garza M, Zazueta-Beltrán J, León-Sicairos N, Bolscher JGM (2010) Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFCin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 23 (3):569-578. doi:10.1007/s10534-010-9306-4
- Gaertner JP, Mendoza JA, Forstner MR, Hahn D (2011) Recovery of Salmonella from biofilms in a headwater spring ecosystem. *Journal of water and health* 9 (3):458-466. doi:10.2166/wh.2011.173
- Gallardo F, Ruiz J, Marco F, Towner KJ, Vila J (1999) Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *Journal of medical microbiology* 48 (4):367-374. doi:10.1099/00222615-48-4-367
- Gaynor M, Mankin AS (2003) Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem* 3 (9):949-961
- Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Teran LM (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135 (1):1-11. doi:S1521-6616(09)00912-7 [pii] 10.1016/j.clim.2009.12.004
- Han SM, Kim JM, Hong IP, Woo SO, Kim SG, Jang HR, Pak SC (2016) Antibacterial Activity and Antibiotic-Enhancing Effects of Honeybee Venom against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 21 (1):79. doi:10.3390/molecules21010079
- Harish BN, Menezes GA (2015) Determination of Antimicrobial Resistance in Salmonella spp. In: Schatten H, Eisenstark A (eds) *Salmonella: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp 47-61. doi:10.1007/978-1-4939-1625-2_3
- Hermans K, Nguyen TL, Roberfroid S, Schoofs G, Verhoeven T, De Coster D, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC (2011) Gene expression analysis of monospecies *Salmonella typhimurium* biofilms using differential fluorescence induction. *Journal of microbiological methods* 84 (3):467-478. doi:10.1016/j.mimet.2011.01.012
- Huo L, Zhang K, Ling J, Peng Z, Huang X, Liu H, Gu L (2011) Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology* 56 (9):869-876. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.02.004
- Ingle DJ, Nair S, Hartman H, Ashton PM, Dyson ZA, Day M, Freedman J, Chattaway MA, Holt KE, Dallman TJ (2019) Informal genomic surveillance of regional distribution of *Salmonella* Typhi genotypes and antimicrobial

- resistance via returning travellers. PLoS neglected tropical diseases 13 (9):e0007620. doi:10.1371/journal.pntd.0007620
- Joerger RD (2003) Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poultry science 82 (4):640-647
- Kamiya H, Ehara T, Matsumoto T, Kamiya H (2012) Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Infection and Chemotherapy 18 (1):47-52. doi:10.1007/s10156-011-0287-1
- Kaura YK, Sharma VK, Chandiramani NK (1982) Enterotoxigenicity and invasiveness of *Salmonella* species. Antonie van Leeuwenhoek 48 (3):273-283
- Klemm EJ, Shakoor S, Page AJ, Qamar FN, Judge K, Saeed DK, Wong VK, Dallman TJ, Nair S, Baker S, Shaheen G, Qureshi S, Yousafzai MT, Saleem MK, Hasan Z, Dougan G, Hasan R (2018) Emergence of an Extensively Drug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi Clone Harboring a Promiscuous Plasmid Encoding Resistance to Fluoroquinolones and Third-Generation Cephalosporins. mBio 9 (1). doi:10.1128/mBio.00105-18
- Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. Jama 298 (15):1763-1771. doi:10.1001/jama.298.15.1763
- Krasinski KM (1987) Virulence versus resistance. Bulletin of the New York Academy of Medicine 63 (3):237-252
- Le Minor L (1988) Typing of *Salmonella* species. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 7 (2):214-218
- Leitch EC, D Willcox M (1999) Lactoferrin increases the susceptibility of *S. Epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin, vol 19. doi:10.1076/ceyr.19.1.12.5342
- León-Sicairos N (2007) Bactericidal activity of bovine lactoferrin, LFampin, LFcin and Chimeric peptide (LFcin-LFampin) against *Vibrio parahaemolyticus*. VIII Conference on Lactoferrin: Structure, Functions and Applications I (I):33
- Leon-Sicairos N, Angulo-Zamudio UA, Vidal JE, Lopez-Torres CA, Bolscher JG, Nazmi K, Reyes-Cortes R, Reyes-Lopez M, de la Garza M, Canizalez-Roman A (2014) Bactericidal effect of bovine lactoferrin and synthetic peptide lactoferrin chimera in *Streptococcus pneumoniae* and the decrease in luxS gene expression by lactoferrin. Biometals 27 (5):969-980. doi:10.1007/s10534-014-9775-y
- Leon-Sicairos N, Canizalez-Roman A, de la Garza M, Reyes-Lopez M, Zazueta-Beltran J, Nazmi K, Gomez-Gil B, Bolscher JG (2009) Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*. Biochimie 91 (1):133-140. doi:10.1016/j.biochi.2008.06.009
- Leon-Sicairos N, Reyes-Lopez M, Ordaz-Pichardo C, de la Garza M (2006) Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronidazole in *Entamoeba histolytica*. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire 84 (3):327-336. doi:10.1139/o06-060
- Lizzi AR, Carnicelli V, Clarkson MM, Antonio DG, Arduino O (2009a) Lactoferrin derived peptides: mechanisms of action and their perspectives as antimicrobial and antitumoral agents. Mini reviews in medicinal chemistry 9 (6):687-695. doi:1389-5575/09 \$55.00+.00
- Lizzi AR, Carnicelli V, Clarkson MM, Di Giulio A, Oratore A (2009b) Lactoferrin derived peptides: mechanisms of action and their perspectives as antimicrobial and antitumoral agents. Mini reviews in medicinal chemistry 9 (6):687-695
- Lupetti A, Brouwer CP, Dogterom-Ballering HE, Senesi S, Campa M, Van Dissel JT, Nibbering PH (2004) Release of calcium from intracellular stores and subsequent uptake by mitochondria are essential for the candidacidal activity of an N-terminal peptide of human lactoferrin. The Journal of antimicrobial chemotherapy 54 (3):603-608. doi:10.1093/jac/dkh385
- dkh385 [pii]
- Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin MR, Hadjifrangiskou M, Tegos GP (2018) Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. Clinical microbiology reviews 31 (3):e00084-00016. doi:10.1128/CMR.00084-16
- Mangalappalli-Illathu AK, Korber DR (2006) Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. Antimicrobial agents and chemotherapy 50 (11):3588-3596. doi:10.1128/AAC.00573-06
- Marshall JM, Flechtner AD, La Perle KM, Gunn JS (2014) Visualization of extracellular matrix components within sectioned *Salmonella* biofilms on the surface of human gallstones. PloS one 9 (2):e89243. doi:10.1371/journal.pone.0089243
- Masson P, Heremans JF, Prignot J (1965) Immunohistochemical localization of the iron-binding protein lactoferrin in human bronchial glands. Experientia 21 (10):604-605

- McQuiston JR, Herrera-Leon S, Wertheim BC, Doyle J, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM, Jr. (2008) Molecular phylogeny of the *salmonellae*: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *Journal of bacteriology* 190 (21):7060-7067. doi:10.1128/JB.01552-07
- Mosquito S, Ochoa TJ, Cok J, Cleary TG (2010) Effect of bovine lactoferrin in *Salmonella* ser. Typhimurium infection in mice. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 23 (3):515-521. doi:10.1007/s10534-010-9325-1
- My NH, Hirao H, Van DU, Morokuma K (2011) Computational studies of bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: mechanism of covalent inhibition of the penicillin-binding protein 2a (PBP2a). *J Chem Inf Model* 51 (12):3226-3234. doi:10.1021/ci2004175
- Naiou L, Satyavathi S (1974) *Salmonella* species at aberrant sites--a review. *Indian journal of medical sciences* 28 (3):149-151
- Oho T, Mitoma M, Koga T (2002) Functional domain of bovine milk lactoferrin which inhibits the adherence of *Streptococcus mutans* cells to a salivary film. *Infection and immunity* 70 (9):5279-5282
- Okanda T, Haque A, Ehara T, Huda Q, Ohkusu K, Miah RA, Matsumoto T (2018) Characteristics of Resistance Mechanisms and Molecular Epidemiology of Fluoroquinolone-Nonsusceptible *Salmonella* enterica Serovar Typhi and Paratyphi A Isolates from a Tertiary Hospital in Dhaka, Bangladesh. *Microb Drug Resist.* doi:10.1089/mdr.2018.0039
- Oppegaard H, Steinum TM, Wasteson Y (2001) Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Applied and environmental microbiology* 67 (8):3732-3734. doi:10.1128/AEM.67.8.3732-3734.2001
- Orsi N (2004) The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 17 (3):189-196
- Pammi M, Abrams SA (2015) Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *The Cochrane database of systematic reviews* (2):Cd007137. doi:10.1002/14651858.CD007137.pub4
- Papenfort K, Bassler BL (2016) Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature reviews Microbiology* 14 (9):576-588. doi:10.1038/nrmicro.2016.89
- Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ (2008) Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of applied microbiology* 104 (1):1-13. doi:JAM3498 [pii] 10.1111/j.1365-2672.2007.03498.x
- Park DA, Lee SM, Peck KR, Joo EJ, Oh EG (2013) Impact of Methicillin-Resistance on Mortality in Children and Neonates with *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. *Infection & chemotherapy* 45 (2):202-210. doi:10.3947/ic.2013.45.2.202
- Peng M, Salaheen S, Buchanan RL, Biswas D (2018) Alterations of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Antibiotic Resistance under Environmental Pressure. *Applied and environmental microbiology* 84 (19):e01173-01118. doi:10.1128/AEM.01173-18
- Ramesh N, Joseph SW, Carr LE, Douglass LW, Wheaton FW (2002) Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poultry science* 81 (6):904-910. doi:10.1093/ps/81.6.904
- Redwan EM, El-Baky NA, Al-Hejin AM, Baeshen MN, Almehdar HA, Elsaway A, Gomaa AB, Al-Masaudi SB, Al-Fassi FA, AbuZeid IE, Uversky VN (2016) Significant antibacterial activity and synergistic effects of camel lactoferrin with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Research in microbiology* 167 (6):480-491. doi:10.1016/j.resmic.2016.04.006
- Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V (2006) Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud publica de Mexico* 48:62-71
- Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V (2017) Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 9 (1):522-554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372
- Ruangcharoen S, Suwannarong W, Lachica MRCT, Bolscher JGM, Nazmi K, Khunkitti W, Taweechaisupapong S (2017) Killing activity of LFchimera on periodontopathic bacteria and multispecies oral biofilm formation in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33 (9):167. doi:10.1007/s11274-017-2334-2
- Sandanayaka VP, Prashad AS (2002) Resistance to beta-lactam antibiotics: structure and mechanism based design of beta-lactamase inhibitors. *Curr Med Chem* 9 (12):1145-1165
- Sha Q, Forstner MR, Hahn D (2013) Diversity of *Salmonella* in biofilms and water in a headwater ecosystem. *FEMS microbiology ecology* 83 (3):642-649. doi:10.1111/1574-6941.12021

- Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, Jr., Briles DE (2004) PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infection and immunity* 72 (9):5031-5040. doi:10.1128/IAI.72.9.5031-5040.2004
- 72/9/5031 [pii]
- Sharma D, Shastri S (2016) Lactoferrin and neonatology - role in neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: present, past and future. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 29 (5):763-770. doi:10.3109/14767058.2015.1017463
- Sheffield CL, Crippen TL, Poole TL, Beier RC (2012) Destruction of single-species biofilms of *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* by dextranase, lactoferrin, and lysozyme. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 15 (4):185-189. doi:10.2436/20.1501.01.171
- Singh PK (2004) Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 17 (3):267-270
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417 (6888):552-555. doi:10.1038/417552a
- Smith-Palmer A, Stewart WC, Mather H, Greig A, Cowden JM, Reilly WJ (2003) Epidemiology of *Salmonella enterica* serovars enteritidis and Typhimurium in animals and people in Scotland between 1990 and 2001. *The Veterinary record* 153 (17):517-520
- Stephenson K, Hoch JA (2002) Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacology & therapeutics* 93 (2-3):293-305
- Taban BM, Aytac SA, Akkoc N, Akcelik M (2013) Characterization of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates determined from ready-to-eat (RTE) salad vegetables. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 44 (2):385-391. doi:10.1590/S1517-83822013005000047
- Tanaka T, Kawabata K, Kohno H, Honjo S, Murakami M, Ota T, Tsuda H (2000) Chemopreventive effect of bovine lactoferrin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Japanese journal of cancer research : Gann* 91 (1):25-33
- Tanida T, Okamoto T, Ueta E, Yamamoto T, Osaki T (2006) Antimicrobial peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from *Candida* cells. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 57 (1):94-103. doi:10.1093/jac/dki402 [pii]
- 10.1093/jac/dki402
- Testa U (2002) *Proteins of iron metabolism*. CRC Press
- Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K (1991) Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of dairy science* 74 (12):4137-4142. doi:S0022-0302(91)78608-6 [pii]
- 10.3168/jds.S0022-0302(91)78608-6
- Tsuda H, Sekine K, Fujita K, Ligo M (2002) Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms--a review of experimental and clinical studies. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 80 (1):131-136
- Vagene AJ, Herbig A, Campana MG, Robles Garcia NM, Warinner C, Sabin S, Spyrou MA, Andrades Valtuena A, Huson D, Tuross N, Bos KI, Krause J (2018) *Salmonella enterica* genomes from victims of a major sixteenth-century epidemic in Mexico. *Nature ecology & evolution* 2 (3):520-528. doi:10.1038/s41559-017-0446-6
- van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K, Veerman EC, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV (2004) Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides* 25 (2):177-183. doi:10.1016/j.peptides.2003.12.006
- van der Kraan MI, Nazmi K, Teeken A, Groenink J, van 't Hof W, Veerman EC, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV (2005) Lactoferrampin, an antimicrobial peptide of bovine lactoferrin, exerts its candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix-facilitating N-terminal part. *Biological chemistry* 386 (2):137-142. doi:10.1515/BC.2005.017
- Vargiu AV, Pos KM, Poole K, Nikaido H (2016) Editorial: Bad Bugs in the XXIst Century: Resistance Mediated by Multi-Drug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in microbiology* 7:833. doi:10.3389/fmicb.2016.00833
- Velusamy SK, Fine DH, Velliyagounder K (2014) Prophylactic effect of human lactoferrin against *Streptococcus mutans* bacteremia in lactoferrin knockout mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 16 (9):762-767. doi:10.1016/j.micinf.2014.07.009

- Velusamy SK, Markowitz K, Fine DH, Velliyagounder K (2016) Human lactoferrin protects against *Streptococcus mutans*-induced caries in mice. *Oral diseases* 22 (2):148-154. doi:10.1111/odi.12401
- Vogel HJ (2012) Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 90 (3):233-244. doi:10.1139/o2012-016
- Waclaw B (2016) Evolution of Drug Resistance in Bacteria. *Advances in experimental medicine and biology* 915:49-67. doi:10.1007/978-3-319-32189-9_5
- Weinberg ED (2003) The therapeutic potential of lactoferrin. *Expert opinion on investigational drugs* 12 (5):841-851. doi:10.1517/13543784.12.5.841
- Wen S, Feng D, Lu Z, Liu J, Peters BM, Tang H, Su D, Lin YP, Yang L, Xu Z, Shirtliff ME, Chen D (2018) Microbial infection pattern, pathogenic features and resistance mechanism of carbapenem-resistant Gram negative bacilli during long-term hospitalization. *Microbial pathogenesis* 117:356-360. doi:10.1016/j.micpath.2018.02.025
- Wilson BA, Salyers AA (2010) *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. ASM Press
- Xu G, Xiong W, Hu Q, Zuo P, Shao B, Lan F, Lu X, Xu Y, Xiong S (2010) Lactoferrin-derived peptides and *Lactoferricin* chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology* 109 (4):1311-1318. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04751.x

Abreviaturas

g: Gramos

mg: miligramos

h: Hora

LF: Lactoferrina

bLF: Lactoferrina bovina

LFcina: Lactoferricina

LFampina: Lactoferrampina

LFquimera: Lactoferrina quimera

LPS: Lipopolisacárido

Log: Logaritmo

μM: Micromolar

μL Microlitros

PBS: Tampón de Fosfato Salino

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro

S. Typhimurium: Salmonella Typhimurium

μM: Micromolar

μL: Microlitros

%: Porcentaje