



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones y proteínas
de leche bovina frente a *Cronobacter sakazakii*.**

Evaluation of the antimicrobial activity of bovine milk fractions and
proteins against *Cronobacter sakazakii*.

Autora

Andrea Sangüesa Romera

Directora

M^a Lourdes Sánchez

Paniagua

Facultad de Veterinaria

2018/2019

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Lourdes Sánchez Paniagua la oportunidad que me ha brindado de pertenecer y colaborar con este grupo de investigación, convirtiéndose en una experiencia muy enriquecedora tanto personal, como profesionalmente. Sin su confianza y apoyo este Trabajo de Fin de Máster no habría sido posible. Además, agradecer a los demás profesores del grupo por su buena acogida.

En segundo lugar, agradecer a Inés Abad sus horas interminables de laboratorio, mano a mano. Enseñándome que trabajar en equipo puede ser una de las sensaciones más enriquecedoras dentro de este mundillo de la investigación, y que los momentos de estrés se hacen más llevaderos juntas. Nunca tendré palabras suficientes para agradecer tu implicación, tu paciencia y tus ganas de hacer las cosas. Aquí comienza una nueva etapa para ti y para mi, amiga.

Por otra parte, destacar la buena convivencia y la ayuda de mis compañeros del Grupo de leche en todo mi recorrido por el laboratorio, haciendo de cada día una nueva aventura. En especial, a Miriam Esteban y a Ana Tobajas, por enseñarme sus conocimientos siempre con una sonrisa y por aguantar mis momentos de locura incansables.

Y por último, pero no menos importante, a mi familia y amigos, los cuales me han motivado y animado siempre para que siguiera haciendo lo que me gusta. Por soportar mis momentos de desesperación, pero también por compartir mis alegrías como si de ellos mismos se tratase. Por vosotros, que os quiero y os querré siempre.

Este Trabajo de Fin de Máster ha sido posible gracias a la financiación del proyecto de AGL2017-82987 del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, y al grupo de investigación ALIPAT (A0_17R) del Gobierno de Aragón.

Índice:

1. Resumen / Abstract	1
2. Abreviaturas	2
3. Objetivos.....	3
4. Introducción	4
4.1. Composición de la leche	4
4.2. Proteínas de la leche de vaca	5
4.2.1. Caseínas.....	5
4.2.2. Proteínas del lactosuero	7
4.3. Membrana del glóbulo graso (MFGM)	10
4.3.1. Estructura y función	10
4.3.2. Proteínas de la MFGM.....	11
4.4. <i>Cronobacter sakazakii</i>	12
4.5. Línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal	14
5. Materiales y métodos:	15
5.1. Aislamiento de fracciones y proteínas a partir de leche bovina	15
5.1.1. Aislamiento de una fracción enriquecida en MFGM	15
5.1.2. Aislamiento de lactadherina.....	15
5.1.3. Aislamiento de mucina	16
5.1.4. Purificación de lactoferrina bovina nativa.....	17
5.2. Preparación de derivados de lactoferrina.....	18
5.2.1. Preparación de lactoferrina bovina nativa y saturada con hierro	18
5.2.2. Conjugación de lactoferrina con biotina	18
5.3. Técnicas electroforéticas.....	18
5.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	18
5.4. Técnicas de tinción de los geles de SDS-PAGE	19
5.4.1. Tinción con azul de Coomassie	19
5.4.2. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)	19
5.5. Preparación de medios de cultivo.....	20
5.6. Ensayos de actividad antimicrobiana frente a <i>Cronobacter sakazakii</i>	20
5.7. Determinación de la concentración de proteína	21
5.8. Inmunodifusión doble	22
5.9. Inmunodotting.....	22
5.10. Técnica de Inmunocap-Estreptavidina	22
5.11. Cultivo celular.....	23
5.11.1. Cultivo y mantenimiento celular	23
5.11.2. Cultivo celular en placas de 6, 24 y 96 pocillos	24
5.12. Evaluación de la citotoxicidad	24
5.13. Ensayo de inhibición de la adhesión bacteriana.....	25
5.14. Determinación del estrés oxidativo	26

5.14.1.	Preparación de homogenados celulares	26
5.14.2.	Determinación del estrés oxidativo en lípidos	26
5.14.3.	Determinación del contenido en proteínas: método Bradford	28
5.14.4.	Determinación del estrés oxidativo en proteínas	28
5.15.	Expresión de receptores TLR2 y TLR4 mediante RT-PCR.....	29
5.16.	Análisis estadístico de los resultados	31
6.	Resultados y discusión	31
6.1.	Aislamiento de lactadherina	31
6.2.	Aislamiento de mucina	32
6.3.	Purificación de la lactoferrina bovina comercial	33
6.4.	Comprobación de la pureza de la lactoferrina bovina mediante la técnica de inmunodifusión doble.....	34
6.5.	Evaluación de los sueros de niños alérgicos a la leche mediante la técnica de InmunoCAP-Streptavidin.....	34
6.6.	Ensayos de actividad antimicrobiana frente a <i>C. sakazakii</i>	36
6.6.1.	Actividad de la lactadherina bovina	36
6.6.2.	Actividad de la lactoferrina bovina nativa.....	37
6.6.3.	Actividad de la mucina bovina	38
6.7.	Evaluación de la citotoxicidad	39
6.8.	Inhibición de la adhesión de <i>C. sakazakii</i> a las células Caco-2/TC7.....	40
6.9.	Determinación del estrés oxidativo	41
6.10.	Expresión de receptores TLR 2 y TLR 4 mediante RT- PCR.....	42
7.	Conclusiones	44
8.	Bibliografía	45

1. Resumen / Abstract

La leche contiene compuestos activos con propiedades biológicas. Entre ellos, cabe destacar las proteínas defensivas con actividad frente a agentes patógenos, como la lactoferrina presente en el lactosuero, y la lactadherina y la mucina, presentes en la membrana de los glóbulos grasos. *Cronobacter sakazakii* es un patógeno emergente que preocupa a la salud pública, puesto que puede producir infecciones en niños y personas inmunodeprimidas. Este patógeno es muy resistente a condiciones de desecación y se ha asociado a la infección transmitida por consumo de leches infantiles en polvo. Por ello, es importante estudiar la posibilidad de utilizar compuestos naturales como agentes preventivos de la infección por *C. sakazakii* y para su control en los alimentos. El objetivo de este Trabajo de Fin de Máster ha sido el aislamiento y caracterización de proteínas lácteas con propiedades defensivas, así como la evaluación de su actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii*, utilizando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. Asimismo, se ha evaluado la viabilidad y el estrés oxidativo celular, y la expresión de los receptores intestinales TLR 2 y TLR 4. Por último, se ha analizado la alergenicidad de la lactoferrina, enfrentándola a antisueros de niños alérgicos a la leche.

Milk contains active compounds with biological properties. Among them, defensive proteins with activity against pathogens, such as lactoferrin, present in the whey, and lactadherin and mucin present in the membrane of the milk fat globule. *Cronobacter sakazakii* is an emerging pathogen that concerns public health, since it can cause infections in children and immunosuppressed people. This pathogen is very resistant to desiccation conditions and it has been associated to consumption of powder formula milk. Therefore, it is important to study the possibility of using natural compounds as preventive agents of the infection by *C. sakazakii* and for its control in food products. The aim of this Master's Thesis has been the isolation and characterization of milk proteins with defensive properties, as well as the evaluation of their antimicrobial activity against *C. sakazakii*, using the cellular line Caco-2 as a model of intestinal epithelium. Likewise, the viability and cellular oxidative stress, and the expression of the TLR 2 and TLR 4 intestinal receptors have been evaluated. Finally, the allergenicity of lactoferrin has been analyzed, confronting it with antisera from children allergic to milk.

2. Abreviaturas

ANOVA: analysis of variance (análisis de varianza)

APS: ammonium persulfate (persulfato amónico)

BCA test: bicinchoninic acid test (test de ácido bicinconínico)

BSA: bovine serum albumin (albúmina sérica bovina)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: epidermal growth factor (factor de crecimiento epidérmico)

FL: fosfolípidos

Ig: inmunoglobulina

NEAA: aminoácidos no esenciales

MFGM: milk fat globule membrane (membrana del glóbulo de grasa de la leche)

MUC1: mucina-1

MUC15: mucina-15

PAS: periodic acid Schiff (ácido peryódico de Schiff)

PBS: phosphate buffered solution (tampón fosfato, pH 7,4)

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS)

TEMED: Tetramethylethylenediamine (tetrametiletilendiamina)

TCA: ácido tricloroacético

TSA: tryptic soy agar (agar tripticasa de soja)

TSB: tryptic soy broth (caldo tripticasa de soja)

UFC: unidades formadoras de colonias

YE: yeast extract (extracto de levadura)

3. Objetivos

El **objetivo principal** de este Trabajo de Fin de Máster ha sido la evaluación de la actividad antimicrobiana de diferentes proteínas bioactivas de leche de vaca frente al patógeno *Cronobacter sakazakii*, utilizando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Aislamiento y caracterización de fracciones y proteínas lácteas.
2. Evaluación de la alergenicidad de la lactoferrina bovina frente a sueros de niños alérgicos a la leche mediante la técnica de InmunoCAP-Streptavidin.
3. Determinación de la actividad antimicrobiana de las proteínas lácteas aisladas frente a *C. sakazakii*.
4. Comparación de la actividad antibacteriana de la lactoferrina bovina de dos orígenes comerciales.
5. Determinación de la capacidad de inhibición de la lactoferrina bovina nativa y saturada con hierro de la adhesión de *C. sakazakii* a la línea celular Caco-2.
6. Evaluación de la viabilidad y el estrés oxidativo de las células Caco-2 en el proceso de inhibición de adhesión de *C. sakazakii* por las proteínas lácteas.
7. Evaluación de la expresión de los receptores TLR 2 y TLR 4 de las células Caco-2 en el proceso de inhibición de adhesión de *C. sakazakii* por las proteínas lácteas.

4. Introducción

4.1. Composición de la leche

Según el Codex Alimentarius (CODEX STAN 206-1999), la leche se define como la secreción mamaria normal de los animales de ordeño obtenidos a partir de uno o más ordeños sin adición ni extracción, destinados al consumo como leche líquida o para su posterior procesamiento. Asimismo, el Reglamento (CE) n° 853/2004 establece que la leche cruda es producida por la secreción de la glándula mamaria de animales de abasto que no haya sido calentada a una temperatura superior a 40°C ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente.

La composición de la leche es similar en todos los mamíferos en lo que se refiere a los principales componentes: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y minerales (Claeys *et al.*, 2014). Sin embargo, la concentración de cada uno de ellos, varía según la especie, adaptándose a las necesidades del recién nacido, tal y como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Composición general de la leche de varias especies en g por 100 g de leche (Gantner, 2015).

<i>Leche</i>	<i>MST</i>	<i>Grasa</i>	<i>Proteína</i>	<i>Lactosa</i>	<i>Cenizas</i>	<i>Energía (kJ/100 g)</i>
<i>Humana</i>	10-13	2,1-4,0	0,9-1,9	6,3-7,0	0,2-0,3	270-209
<i>Yegua</i>	9-12	0,4-7,2	1,3-2,0	6,0-7,2	0,3-0,5	109-210
<i>Mona</i>	8-12	0,3-1,8	1,4-2,0	5,8-7,4	0,3-0,5	160-180
<i>Búfala</i>	16-17	5,3-15,0	2,7-4,7	3,2-4,9	0,8-0,9	420-480
<i>Vaca</i>	12-13	3,3-6,4	3,0-4,0	4,4-5,6	0,7-0,8	270-280
<i>Cabra</i>	12-16	3,0-7,2	3,0-5,2	3,2-4,5	0,7-0,9	280-290
<i>Oveja</i>	18-20	4,9-9,0	4,5-7,0	4,1-5,9	0,8-1,0	410-440

* *MST: Materia seca total*

Los componentes de la leche están organizados de la siguiente manera: proteínas en dispersión coloidal en forma de micelas, lípidos emulsionados en forma de glóbulos recubiertos de una membrana, y la mayoría de los minerales y toda la lactosa en solución verdadera.

Las **proteínas** presentes en la leche pueden dividirse en tres grupos, las proteínas del

suelo, las cuales representan un 20%; las caseínas, que representan un 80%, y en una proporción minoritaria se encuentran las proteínas presentes en la membrana del glóbulo graso (Hazlett *et al.*, 2019).

Por otro lado, se encuentran los **lípidos**, los cuales se presentan como glóbulos emulsionados en la fase acuosa, representando esta el 87% de la leche. Dichos glóbulos grasos están rodeados por una membrana compuesta por fosfolípidos, proteínas, colesterol y enzimas, entre otros componentes, en una capa denominada membrana del glóbulo graso (MFGM, del nombre en inglés, *milk fat globule membrane*). El diámetro de los glóbulos varía de 1 a 10 μm , siendo el tamaño medio de 4 μm . Los glóbulos que presentan una superficie mayor son digeridos por las enzimas lipolíticas encontradas durante su paso a través del tracto digestivo, facilitando la lipólisis de los triglicéridos de la leche y la absorción de los productos de la digestión (Jensen *et al.*, 1995). Los triglicéridos (TG) representan el 98% de los lípidos de la leche, confiriéndole a esta sus propiedades principales como el punto de fusión, la hidrofobicidad, etc. (MacGibbon *et al.*, 2006).

Por último, el principal **carbohidrato de la leche** es la lactosa, constituyendo alrededor del 99% de los carbohidratos de la leche. Se trata de un disacárido formado por glucosa y galactosa unidas entre sí, y se encuentra en una concentración de 49 g/L (Guetouache *et al.*, 2014). Además de la lactosa, la leche contiene trazas de otros azúcares, incluyendo glucosa, fructosa, glucosaminas y oligosacáridos, entre otros. Los oligosacáridos están divididos en dos tipos, ácidos y neutros, y en el calostro bovino se encuentran en una concentración de aproximadamente 0,7 a 1,2 g/L (McGrath *et al.*, 2016).

4.2. Proteínas de la leche de vaca

4.2.1. Caseínas

En la leche, las caseínas se encuentran formando agregados de 40-300 nm de diámetro, llamados micelas de caseína. La estructura de las caseínas es una estructura sólida y esponjosa, que las mantiene dispersas en un medio acuoso, presentando un diámetro medio de 160 nm, y adquiriendo como función principal fluidificar las moléculas de caseína y solubilizar el fosfato cálcico (Ferrandini *et al.*, 2006). Las micelas de caseína están formadas por un 92% de caseína y un 8% de sales, conteniendo el 80% de la proteína total de la leche. La micela de caseína se compone de cuatro tipos principales

de caseínas individuales: α_{S1} -, α_{S2} -, β - y κ -caseína (Lomholt, 1996).

La estructura de las micelas de caseína ha sido ampliamente debatida durante los últimos años. Hasta ahora, se han desarrollado dos modelos principales que describen la estructura interna de la micela de caseína: el modelo de submicela y el modelo de *nanocluster* (Hazlett *et al.*, 2019).

El **modelo submicelar** sugiere que la micela de caseína está compuesta por submicelas más pequeñas fusionadas mediante enlaces hidrofóbicos con fosfato de calcio coloidal. Este modelo se basa en la hipótesis de que hay dos formas de unidades submicelares presentes en una micela de caseína: unas submicelas ricas en κ -caseína y unas submicelas pobres en κ -caseína. Las submicelas ricas en κ -caseína se encontrarían en la superficie, mientras que las pobres en κ -caseína se encontrarían en la estructura interna de la micela, tal y como se muestra en la Figura 1 (Horne, 2006).

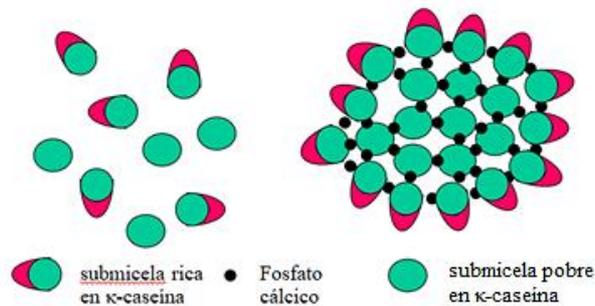


Figura 1. Esquema del modelo submicelar de las micelas de caseína (Horne, 2006).

El **modelo de nanocluster** representa la estructura interna de las micelas de caseína como una red de caseínas α y β unidas por interacciones hidrofóbicas. Esta red de caseína contiene nanoclusters de fosfato cálcico coloidal, que actúan para estabilizar la estructura de la red de caseína, y una distribución más escasa de κ -caseína en la superficie de la micela de caseína, tal y como se puede observar en la Figura 2.

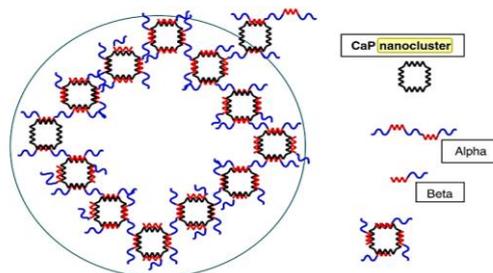


Figura 2. Esquema del modelo nanocluster (Horne, 2006).

Los modelos de submicelas y de nanocluster conservan la característica clave de que el fosfato cálcico coloidal, que se encuentra dentro de la micela de caseína, desempeña un

papel esencial en la estabilización de la caseína sensible al calcio, presente en el interior de la micela.

4.2.2. Proteínas del lactosuero

En el suero se encuentran las proteínas solubles, representando el 20% de las proteínas totales de la leche. Las concentraciones reales de las proteínas del suero dependen del tipo de suero (ácido o dulce), la fuente de leche (bovina, caprina u ovina), la época del año, el tipo de alimento, la etapa de lactancia y la calidad del procesado.

Las proteínas del suero bovino incluyen: β -lactoglobulina (β -LG), α -lactalbúmina (α -LA), inmunoglobulinas (IgG), albúmina de suero bovino (BSA), lactoferrina (LF) y lactoperoxidasa (LP) (Madureira *et al.*, 2007).

La **β -lactoglobulina** es una de las proteínas más abundantes del lactosuero, representando aproximadamente el 50% de la proteína de suero total en la leche bovina, siendo su concentración en la leche calostrual de 18 mg/mL (Pérez *et al.*, 1990). Se han propuesto para esta proteína algunas funciones como el transporte de retinol y ácidos grasos, la estimulación de la lipasa pregástrica, la transferencia de la inmunidad pasiva al recién nacido y la regulación del metabolismo del fósforo en la glándula mamaria (Madureira *et al.*, 2007). El contenido de aminoácidos de esta proteína es muy importante, debido a que, además de estimular el crecimiento muscular, es una fuente rica en cisteína, un aminoácido esencial para la síntesis de otros péptidos (De Wit, 1990).

La **α -lactalbúmina** es la segunda proteína más abundante del lactosuero y su concentración en la leche bovina varía entre 1,2 y 1,5 g/L. Su función principal en la glándula mamaria es la de modular la actividad del enzima galactosil-transferasa en la síntesis de lactosa (Permyakov y Berliner, 2000).

Las **inmunoglobulinas** pertenecen a una familia de proteínas de alto peso molecular que comparten características fisicoquímicas y determinantes antigénicos comunes. Estas proteínas se encuentran en el suero y en otros fluidos corporales de los animales. Se han encontrado tres tipos de inmunoglobulinas en la leche de vaca: IgG, IgA e IgM. Las inmunoglobulinas IgG pueden ser divididas en dos subclases: IgG1 e IgG2 (Butler, 1969). Su principal función es transferir inmunidad pasiva al recién nacido, protegiéndolo de numerosas enfermedades (Madureira *et al.*, 2007).

La **albumina sérica bovina** no se sintetiza en la glándula mamaria, sino que aparece en

la leche después de una transferencia pasiva procedente del torrente sanguíneo. Posee 17 puentes disulfuro intermoleculares y un grupo tiol en el residuo 34 (Fox, 1989). Una propiedad importante que se ha asociado a la BSA es la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral (Madureira *et al.*, 2007).

La **lactoferrina** es una proteína minoritaria del lactosuero, que pertenece a la familia de las transferrinas. Es una glicoproteína, monomérica, quelante de hierro, con un peso molecular de 80 kDa. Está presente en el cuerpo humano como una proteína secretora, sintetizada por las células epiteliales glandulares y los neutrófilos maduros, y se puede encontrar en la leche, saliva, lágrimas, secreciones nasales e intestinales, jugo pancreático y líquido seminal, así como en los gránulos secundarios de los neutrófilos (Lönnerdal e Iyer, 1995).

La lactoferrina (Figura 3) se compone de una cadena única que contiene 703 aminoácidos plegados en dos lóbulos globulares. Estos lóbulos, también llamados regiones terminales C- (carboxi) y N- (amino) están unidos con una hélice α . Cada lóbulo consta de dos dominios conocidos como C1, C2, N1 y N2, y estos crean un sitio de unión de hierro en cada lóbulo, pudiendo unir un átomo de metal en forma de ión férrico en sinergia con el ion carbonato (González-Chávez *et al.*, 2009). Las moléculas de lactoferrina contienen (según la especie y la proteína) un número variable de sitios para la posible glicosilación, principalmente en la superficie de la molécula. Dependiendo del grado de saturación de hierro de la lactoferrina, se puede encontrar en tres formas: apolactoferrina (sin hierro), forma monoférrica (un ion Fe^{3+}) y hololactoferrina (dos iones Fe^{3+}) (Adlerova *et al.*, 2008).

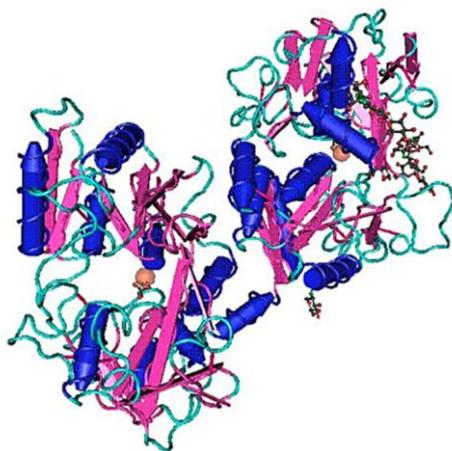


Figura 3. Estructura tridimensional de la lactoferrina bovina biférrica a una resolución de 2,8 Å, donde se pueden observar los dos lóbulos y en el interior de cada uno un átomo de hierro representado en color rosado (González-Chávez *et al.*, 2009).

Debido a las características estructurales de la lactoferrina, está involucrada en diversas funciones fisiológicas, desempeñando actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos como levaduras, hongos, virus y bacterias (Gram-positivas y Gram- negativas). Dicha actividad se debe principalmente a dos mecanismos, el primero es el secuestro de hierro en los sitios de infección, que priva al microorganismo de dicho nutriente, y crea así un efecto bacteriostático. El segundo mecanismo, es la interacción directa de la molécula de lactoferrina con la membrana bacteriana, desestabilizándola y creando un efecto bactericida. Por otro lado también se atribuyen a la lactoferrina funciones de actividad antivírica, antiparasitaria, antifúngica, antiinflamatoria y antitumoral (Adlerova, Bartoskova y Faldyna, 2008).

La introducción de la lactoferrina como un nuevo ingrediente alimentario se aprobó por la Comisión Europea en 2012 mediante dos decisiones, estableciendo los valores máximos permitidos, especificaciones y usos pertinentes (Tabla 2).

Tabla 2. Uso de la lactoferrina bovina (Decisión de Ejecución de la Comisión Europea de 22 de noviembre de 2012 a,b).

USOS DE LA LACTOFERRINA BOVINA (LFb)

Categoría de alimentos	Niveles máximos de uso de LFb
Preparados para lactantes y preparados de continuación (listos para su consumo)	100 mg/100 ml
Alimentos a base de leche destinados a niños de corta edad (listos para su consumo)	200 mg/100 g
Alimentos elaborados a base de cereales (sólidos)	670 mg/100 g
Alimentos para usos médicos especiales	En función de las necesidades de las personas, hasta 3 g/día
Bebidas a base de leche	200 mg/100 g
Mezclas en polvo para bebidas a base de leche (listas para su consumo)	330 mg/100 g
Bebidas a base de leche fermentada (incluidas bebidas de yogur)	50 mg/100 g
Bebidas no alcohólicas	120 mg/100 g
Productos a base de yogur	80 mg/100 g
Productos a base de queso	2 000 mg/100 g
Helados	130 mg/100 g
Pasteles y pastas	1 000 mg/100 g
Caramelos	750 mg/100 g
Chicle	3 000 mg/100 g

4.3. Membrana del glóbulo de grasa (MFGM)

4.3.1. Estructura y función

El glóbulo de grasa es uno de los componentes lácteos que se sintetiza en la glándula mamaria y se libera a la leche en forma de vesículas. La MFGM rodea el glóbulo de grasa secretado por las células epiteliales productoras de leche y tiene una estructura compleja que contiene diversos lípidos, como triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol, así como proteínas y otras macromoléculas (Gallier *et al.*, 2015).

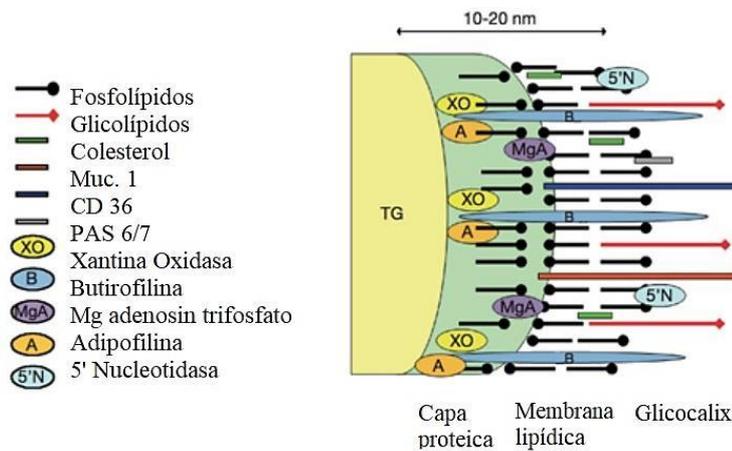


Figura 4. Distribución de los diferentes lípidos y proteínas presentes en la MFGM (Vanderghem *et al.*, 2010).

La MFGM se puede describir como un empaquetamiento heterogéneo de una membrana que envuelve una fase líquida, con una distribución asimétrica. El tamaño de los glóbulos grasos también es heterogéneo (0,1 – 10 μm) y dependiendo de ello, puede haber ciertas variaciones en su composición. Cuando el tamaño del glóbulo de grasa es menor, el contenido de ácidos grasos de cadena media aumenta y los ácidos grasos de cadena larga saturados disminuyen respecto a los glóbulos grasos de mayor tamaño. Así mismo, en la membrana disminuye el contenido de fosfatidilcolina y esfingomiélin (Lopez *et al.*, 2011).

Las ocho proteínas más representativas de la MFGM se dividen en dos grupos: las glicoproteínas, que son seis e incluyen a la MUC1, xantina oxidoreductasa, MUC15, lactadherina (PAS 6/7), CD36 y la butirofilina. Y las no glicosiladas, siendo la adipofilina y la proteína de unión a ácidos grasos. Las proteínas MFGM varían en la MFGM con la etapa de la lactancia, y desempeñan varias funciones de gran relevancia para la actividad celular, la promoción y la defensa del crecimiento celular (Riccio, 2004).

Los compuestos glicosilados de los glóbulos grasos, así como los productos derivados de su hidrólisis, han mostrado actividades antibacterianas, antivirales y antitoxinas (Dewettinck *et al.*, 2008).

4.3.2. Proteínas de la MFGM

La **lactadherina** (Figura 5) es una glicoproteína multifuncional, compuesta por dos variantes de glicosilación, PAS-6/7 de 53 a 66 kDa, que está presente en la membrana del glóbulo graso. La lactadherina bovina tiene una estructura formada por los dominios denominados EGF1, EGF2, C1 y C2, donde EGF indica la homología con el dominio del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*), y C1 y C2 representan los dominios carboxilo terminales. Diferentes estudios demuestran que la lactadherina puede actuar como un enlace entre dos superficies uniéndose a ciertos receptores a través de su extremo N-terminal, y a fosfolípidos a través de su extremo C-terminal (Andersen *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 2000).

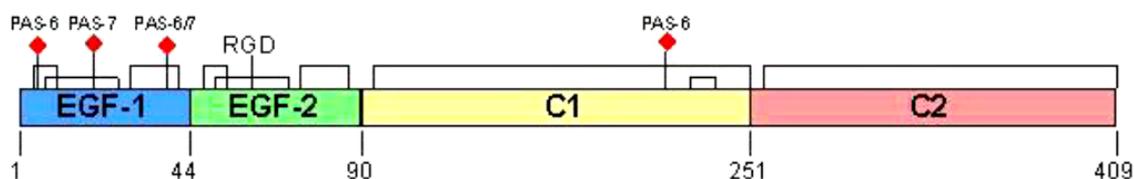


Figura 5. Representación de la estructura de la lactadherina bovina. Los sitios de glicosilación de PAS-6 y PAS-7 están marcados con \blacklozenge . Los puentes disulfuro se muestran con líneas (Hvarregaard *et al.*, 1996).

Debido a su estructura multidominio, la lactadherina participa en muchos procesos biológicos y fisiológicos, que incluyen fagocitosis, angiogénesis, aterosclerosis, remodelación de tejidos y regulación de la hemostasia (Kamińska *et al.*, 2018). También se ha demostrado que la lactadherina tiene actividad atenuante frente a la infección por rotavirus y *Escherichia coli* enterotóxica (Rasmussen *et al.*, 2009; Raymond *et al.*, 2009).

La **mucina** (Figura 6) es una glicoproteína extracelular, altamente glicosilada, que está formada por varios tipos, MUC15, MUC1 y MUCX, y tiene un peso molecular que varía de 95 a 200 kDa. El núcleo de la proteína que constituye el 20% del total de la masa molecular, está organizado en distintas regiones. En primer lugar, una región glicosilada central, compuesta por repeticiones en tándem de serina, treonina y prolina (STP). En segundo lugar, se encuentran cadenas globulares con alta glicosilación en el extremo N-terminal, y regiones ricas en cisteína en el extremo C-terminal, que

favorecen la formación de enlaces y la formación de multímeros (Bansil y Turner, 2016).

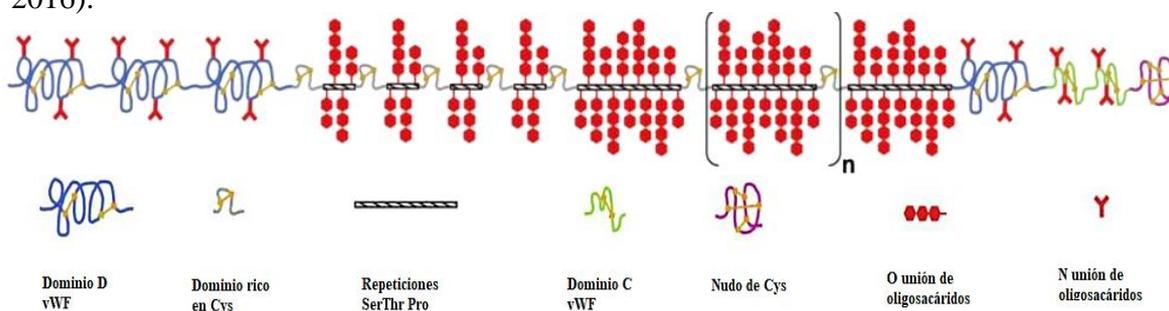


Figura 6. Estructura de la mucina, organizada con los distintos dominios (Bansil y Turner, 2006).

Las mucinas tienen distintas funciones entre las que cabe destacar su capacidad antimicrobiana frente a microorganismos, desempeñando también un importante papel en la respuesta inmune innata (Kutta *et al.*, 2008).

4.4. *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter sakazakii es un bacilo Gram negativo, perteneciente al género *Cronobacter* de la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro del género de *Cronobacter* se encuentran diferentes especies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* y *C. condimentii* (Joseph *et al.*, 2012).

Es una bacteria móvil, anaerobia facultativa, no formadora de esporas, con flagelos móviles y su tamaño es aproximadamente de 1-3 μm . Es capaz de crecer en un amplio intervalo de temperatura, de 6 a 47°C, siendo su temperatura óptima de 39°C (Iversen y Forsythe, 2003). Asimismo, tiene una gran resistencia a bajas actividades de agua (a_w), en un rango de 0,30 a 0,83. Todas estas características le confieren a este patógeno la capacidad de crecer en un gran número de alimentos (Lin y Beuchat, 2007).

Cronobacter sakazakii típicamente presenta dos tipos diferentes de colonias morfológicas cuando los aislamientos se realizan en agar de tripticasa de soja (TSA). El tipo A, también llamado mate, incluye colonias grandes, secas o mucoides con bordes ondulados, que son gomosas cuando se tocan con un asa. El tipo B se conoce como brillante y liso, es de textura suave o pastosa, y a menudo exhibe cantidades relativamente pequeñas de producción de pigmento. Alrededor del 80% de las cepas producen un pigmento amarillo dependiente de la temperatura (Yan y Gurtler, 2014).

Las diferencias entre *C. sakazakii* y otras especies de *Cronobacter* han demostrado que la mayoría de cepas de *C. sakazakii* son capaces de utilizar los azúcares L-arabinosa, D-

celobiosa, D-fructosa, D-glucosa, D-galactosa, x-metil-D-glucósido, D-maltosa, D-sacarosa y D-trehalosa, así como el D-manitol. Tras el crecimiento en TSA a 25°C, *C. sakazakii* es positivo para malonato y catalasa, carece de producción de gas H₂S y es negativo para oxidasa (Yan y Gurtler, 2014).

Cronobacter sakazakii es un grupo importante de patógenos emergentes oportunistas transmitidos por alimentos que pueden causar infecciones sistémicas raras pero graves, como meningitis, septicemia y enterocolitis necrosante en recién nacidos (Lou *et al.*, 2014). Los niños prematuros, con bajo peso al nacimiento o con inmunodepresión, forman parte del grupo de alto riesgo. Se han descrito tasas de mortalidad con valores del 40 al 80 % y los supervivientes padecen habitualmente secuelas neurológicas severas (AECOSAN, 2015). Desde 1961 hasta 2008 se notificaron unos 120 casos en todo el mundo en niños de hasta 3 años de edad (FAO/OMS, 2008a).

Se cree que la principal vía de transmisión de la infección por *C. sakazakii* es la oral. No se ha determinado la dosis infectiva, pero se estima que puede ser baja (10-100 microorganismos). No obstante, su amplia distribución lleva a pensar que la ingestión de niveles bajos de microorganismos a través de preparados para lactantes y alimentos de continuación por bebés y niños sanos no produce la enfermedad (EFSA, 2004).

Debido a las infecciones neonatales, *C. sakazakii* se asocia con el consumo de fórmulas infantiles y leches en polvo. Sin embargo, también se ha aislado de una amplia gama de ambientes y alimentos. Dado que el organismo no forma parte de la microbiota intestinal normal animal ni humana, es probable que el suelo, el agua y las verduras sean las principales fuentes de la contaminación de los alimentos. *C. sakazakii* ha sido aislado de una gran variedad de alimentos, que incluyen queso, pan fermentado, tofu, embutidos, carne picada y salchichas de carne. Este microorganismo también se ha encontrado en el pan khamir, debido a que forma parte de la microbiota natural de la superficie de la semilla de sorgo (Iversen y Forsythe, 2003).

Cronobacter sakazakii puede formar *biofilms*, que son bacterias sésiles agregadas a la superficie e incrustadas en una matriz compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. La formación de *biofilms* mejora la resistencia de las células al estrés ambiental y brinda protección frente a medicamentos y desinfectantes. En la industria alimentaria, los *biofilms* son una fuente importante de contaminación bacteriana en las superficies en contacto con los alimentos y su eliminación es difícil (Du *et al.*, 2012).

Las infecciones gastrointestinales causadas por microorganismos como *C. sakazakii* producen inflamación intestinal. Después de una infección microbiana o daño tisular, la inflamación es importante para la protección del huésped a través de la destrucción de los patógenos invasores y el inicio de mecanismos de reparación finalmente diseñados para restaurar la homeostasis. La inmunidad innata desempeña un papel clave en la inflamación aguda al actuar como el sistema primario de defensa del huésped con el objeto de responder rápidamente a las lesiones microbianas y al daño tisular (De Nardo, 2015). Las células inmunes innatas expresan varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen las moléculas que son características de los patógenos. Estas moléculas se consideran un componente esencial para la supervivencia del patógeno y se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En los mamíferos, se han identificado 12 miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR). Los TLR son glicoproteínas integrales de membrana tipo I y tienen una estructura trimodular. El dominio N-terminal extracelular es rico en leucina, y el dominio C-terminal intracelular se conoce como dominio del receptor Toll/ IL-1 (TIR). Este dominio es necesario para la interacción y el reclutamiento de diversas moléculas adaptadoras para activar la vía de señalización en cadena. Los TLR reconocen varios PAMP derivados de virus, bacterias patógenas, hongos patógenos y protozoos parásitos (Kumar, Kawai y Akira, 2009).

4.5. Línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal

La línea celular Caco-2 es una línea establecida de células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano. Aunque estas células derivan de un carcinoma de colon, cuando se cultivan en condiciones específicas, las células se diferencian y polarizan de manera que su fenotipo, morfología y funcionalidad se asemeja a los enterocitos que recubren el intestino delgado. Las células Caco-2 expresan uniones estrechas, microvellosidades y una serie de enzimas y transportadores que son característicos de dichos enterocitos (Hidalgo, Raub y Borchardt, 1989; Sánchez *et al.*, 1996).

5. Materiales y métodos:

5.1. Aislamiento de fracciones y proteínas a partir de leche bovina

5.1.1. Aislamiento de una fracción enriquecida en MFGM

Para el aislamiento de la fracción enriquecida en las proteínas de la membrana del glóbulo graso, se partió de leche bovina cruda suministrada por Villacorona (El Burgo de Ebro, España), y se desnató dos veces con una centrífuga desnatadora ARR-DES 125 (Suministros Químicos Arroyo, Santander, España), obteniendo la nata.

Para la obtención de la mazada, a la nata se le añadió un tampón compuesto por fosfato potásico 1,5 mM, fosfato sódico 8 mM, cloruro potásico 3 mM, cloruro de sodio 0,14 mM, pH 7,4, (PBS), al que se añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, en una proporción 2:1 (v/v). La nata se batió con una batidora Philips Cucina (Ámsterdam, Holanda) a la máxima potencia, hasta que se produjo la inversión de fases, obteniendo así la mazada y la mantequilla. Los granos de mantequilla se pasaron por unas gasas de quesería, obteniendo la fase acuosa o mazada, que se denomina habitualmente con su nombre en inglés, *buttermilk*.

Para la obtención de la fracción denominada *butterserum*, la mantequilla elaborada por el procedimiento anterior se calentó en una estufa térmica durante 25 min a 50°C. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 40.000 x g a 4°C, obteniendo así dos fases diferenciadas. Por una parte, la fase acuosa o el *butterserum* que se encontraba en la fase inferior, mientras que la parte superior estaba formada por aceite de mantequilla en estado sólido. Se obtuvo el *butterserum* con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y se congeló a -20°C.

La mazada y el *butterserum* se mezclaron en una proporción 7:1 (v:v), se acidificó el pH hasta 4,8 con HCl 1 M y se agitó durante 30 min a 4°C. A continuación, se centrifugó a 4.000 x g durante 30 min a 4°C. El precipitado que se obtuvo se resuspendió con agua mili-Q hasta que se disolvió por completo y se reajustó el pH hasta 6,8 con NaOH 1 M, considerándolo la fracción enriquecida en MFGM.

5.1.2. Aislamiento de lactadherina

El protocolo de aislamiento de lactadherina se llevó a cabo según el descrito por Kim *et al.* (1992) con algunas modificaciones.

La fracción enriquecida en MFGM obtenida como se ha descrito anteriormente, se delipidó con 9 volúmenes de una mezcla de cloroformo y metanol en la proporción 2:1 y se incubó durante toda la noche en agitación suave a 4°C. Se formó un precipitado que se agitó en el vórtex y se añadió 1 volumen de agua mili-Q para romper la emulsión, centrifugando la mezcla a 3.400 x g durante 15 min a 10°C. Tras dicha centrifugación, se recuperó la fracción intermedia entre el metanol, que se encuentra en la parte superior, y el cloroformo, que se encuentra en la parte inferior. Se añadió un volumen de agua destilada y se procedió a la eliminación de los solventes orgánicos con ayuda de un rotavapor Laborota 4000 de Heidolph (Schwabach, Alemania).

Seguidamente, la MFGM se resuspendió con NaCl 0,02 M y se centrifugó a 25.000 x g durante 1 h a 4°C. Después de la centrifugación, el precipitado obtenido se disolvió en un tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, el cual contenía urea 5 M, KCl 1 M y benzamidina 0,2 mM, como inhibidor de proteasas, y se dejó en agitación durante 12 h a 4°C. La mezcla se centrifugó a 40.000 x g durante 30 min a 4°C, y se concentró el sobrenadante obtenido mediante dispositivos de ultrafiltración centrífuga de punto de corte de 10 kDa.

La cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel se utilizó para la purificación de la lactadherina. Se utilizó una columna de Sephacryl S-200 (3 x 36 cm) y se equilibró con un tampón compuesto por Tris-HCl 0,1 M, KCl 1 M, urea 7 M, y benzamidina 0,2 mM. Se añadió un volumen de muestra concentrada de aproximadamente 1,2 ml a un flujo de 0,2 mL/min, y se recogió un volumen de 1,6 mL por fracción.

La absorbancia de las fracciones obtenidas se determinó a 280 nm en un espectrofotómetro modelo 6505 UV/Vis de Jenway (Stone, Reino Unido). Por último, las fracciones enriquecidas en lactadherina, obtenidas en la cromatografía, se mezclaron y concentraron mediante dispositivos de ultrafiltración centrífuga (Amicon INC., Beverly, MA, EE. UU.) con un punto de corte de 10 kDa. Posteriormente, las fracciones se analizaron mediante electroforesis en SDS, como se describe más adelante.

5.1.3. Aislamiento de mucina

El aislamiento de mucina se desarrolló siguiendo el protocolo de Gallier *et al.* (2012) y Le *et al.* (2012).

Se partió de una fracción de butterserum, obtenida como se ha indicado anteriormente y conservada a -20°C . En un tubo falcon de 50 mL se prepararon las muestras que se iban a degradar enzimáticamente, con el objetivo de eliminar todas las proteínas salvo la mucina que es resistente a la proteólisis. Así, se adicionaron 1,5 mL de mazada y 18,5 mL de ácido fórmico al 5%, obteniendo 20 mL de volumen final, con un pH inferior a 2. A continuación, se procedió al tratamiento de la mezcla con pepsina gástrica porcina (Sigma-Aldrich), la cual se añadió en una proporción 0,4:100 (p/p). Se incubó a 37°C durante 2 h en agitación suave y pasado este tiempo se inactivó la pepsina ajustando el pH a 7 con NaOH 4 M. Posteriormente, la mezcla procedente de la hidrólisis se concentró con una célula de ultrafiltración (Amicon INC., Beverly, MA, EE. UU.), utilizando una membrana con un punto de corte de 30 kDa y obteniendo 2 mL de proteína concentrada.

A continuación, la muestra hidrolizada y concentrada se sometió a una cromatografía de filtración en gel en una columna de Sepharose CL-2B (90 x 1 cm), siguiendo el protocolo de Kodama y Kimura (2001). Se aplicó un volumen de 1,5 mL de hidrolizado concentrado a la columna previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, con NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM y 0,02% de azida sódica. La elución se realizó a un flujo de 0,5 mL/min y las fracciones recogidas fueron de 3 mL, determinándose su absorbancia a 280 nm. Las fracciones se caracterizaron por electroforesis con SDS, como se describe más adelante.

5.1.4. Purificación de lactoferrina bovina nativa

Para la purificación de la lactoferrina bovina comercial donada por Tatura Nutritionals (Morrinsville, Nueva Zelanda), se utilizó un filtro Sartobind[®] Membrane Adsorber Unit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de 75 cm^2 . El filtro está compuesto por una membrana de celulosa derivatizada con grupos sulfónicos, que actúa como intercambiador catiónico fuerte. Al estar cargado negativamente, las proteínas básicas como la lactoferrina se quedan unidas a dicho filtro hasta que son eluidas con un aumento de la fuerza iónica.

Para realizar el proceso de elución se pasó por el filtro un tampón fosfato sódico 20 mM a pH 7, con diferentes concentraciones de NaCl: 0,2 M, 0,5 M, 1 M y 2 M. Entre cada elución se realizaron dos lavados con tampón fosfato y se determinó la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas.

5.2. Preparación de derivados de lactoferrina

5.2.1. Preparación de lactoferrina bovina nativa y saturada con hierro

La lactoferrina bovina nativa comercial utilizada fue donada por Tatura Nutritionals (Morrinsville, Nueva Zelanda).

Para la preparación de la lactoferrina bovina nativa, se pesaron 40 mg de lactoferrina y se diluyeron en 2 mL de agua destilada. A continuación, se esterilizó la solución de proteína con filtros Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de baja unión a proteínas, de tamaño de poro de 0,22 μm .

Para determinar la concentración de lactoferrina tras la filtración, se diluyó 1:10 en agua mili-Q y se midió su absorbancia a 280 nm. Posteriormente, se calculó la concentración de lactoferrina a partir de su coeficiente de extinción ($E^{1\%}_{280}$) de 1,27 mL/cm/g.

Para la preparación de la lactoferrina saturada con hierro se utilizó un complejo férrico de nitrilo acetato de sodio (FeNTA,) 80 mM y FeCl_3 20 mM. Primero, se preparó la disolución de lactoferrina en agua destilada y 0,9% de NaCl. A continuación, se preparó el NaHCO_3 10 mM del que se adicionaron 3 μL junto con 3 μL del FeNTA por cada mg de lactoferrina, para favorecer la fijación del hierro a la proteína, y se incubó la solución durante 24 h a 4°C para favorecer su unión.

5.2.2. Conjugación de lactoferrina con biotina

La lactoferrina bovina procedente de Tatura Nutritionals se marcó con biotina para realizar los ensayos de alergenicidad de esta proteína.

La lactoferrina se disolvió en PBS a una concentración de 2 mg/mL. El complejo NHS-biotina se disolvió en dimetil sulfóxido a una concentración de 10 mg/mL y se añadió a la solución de lactoferrina en un exceso de 50 veces su concentración. La reacción se llevó a cabo manteniendo la mezcla a 0°C durante 2 h. La biotina que no reaccionó con la lactoferrina se eliminó por diálisis frente a PBS durante 36 h.

5.3. Técnicas electroforéticas

5.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

En primer lugar, para preparar las muestras para electroforesis se diluyeron 1:2 (v/v) en un tampón compuesto por Tris-HCl 126 mM, pH 6,8, con 4% de SDS, 0,02% de azul de bromofenol, 20% de glicerol y 10% de 2-mercaptoetanol, y se calentaron en un baño

durante 5 min a 95°C para su desnaturalización. Posteriormente, las muestras se cargaron en los pocillos de un gel de poliacrilamida 4-20 % (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.) y la electroforesis se desarrolló aplicando un voltaje de 180 V en un equipo Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).

5.4. Técnicas de tinción de los geles de SDS-PAGE

Dependiendo del tipo de proteínas que se pretendían visualizar en las muestras, se utilizaron dos tipos de tinciones diferentes, tinción con Azul de Coomassie y tinción PAS.

5.4.1. Tinción con azul de Coomassie

Tras realizar la electroforesis, el gel de poliacrilamida se cubrió con colorante Azul de Coomassie, compuesto por 0,65 g de Coomassie Blue R (Serva, Heidelberg, Alemania), 300 mL de metanol, 100 mL de 16 ácido acético, 100 mL de glicerol y 500 mL de agua destilada, y se dejó en agitación suave durante 1 h. A continuación, se retiró el colorante y se añadió el decolorante compuesto por 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada. Se dejó en agitación durante 1 h y se retiró. Por último, se cubrió el gel con el mismo decolorante y se dejó actuar hasta que las zonas en las que no había bandas de proteína quedaron incoloras.

5.4.2. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)

La tinción con ácido peryódico de Schiff se utilizó para la visualización de las glicoproteínas. Primero, el gel se cubrió con 50 mL de una solución de fijación constituida por ácido acético, metanol y agua destilada (10:35:55, v/v/v) y se mantuvo durante toda una noche a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación, se retiró dicha solución y se añadió una solución de peryodato preparada con 0,35 g de ácido peryódico en 50 mL de ácido acético glacial al 5% (v/v), y se incubó en agitación durante 1 h. Tras la incubación, se lavó el gel 2 veces con agua Milli-Q y se añadieron 50 mL de una solución de metabisulfito, compuesta por 0,2 g de metabisulfito sódico en 100 mL de ácido acético glacial al 5% (v/v) hasta que el gel adquirió un color amarillento. Posteriormente, se retiraron los 50 mL de dicha solución y se añadieron otros 50 mL para decolorar el gel, en agitación suave durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadió el reactivo de Schiff y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 h en agitación. Para decolorar el gel, se añadieron 50 mL de la misma solución de fijación utilizada anteriormente, dos veces con una incubación de 7 min cada una, en agitación

suave. Para finalizar, se le añadió al gel un tampón de decoloración compuesto por ácido acético y agua destilada (1:9) y se mantuvo durante 7 min.

En el caso de que se quisiera teñir el gel por los dos métodos, se procedía a realizar, en primer lugar, la tinción PAS y seguidamente, la tinción con Azul de Coomassie.

5.5. Preparación de medios de cultivo

El caldo de tripticasa de soja (TSB, del inglés 'tryptic soy broth') (Merck, Darmstad, Alemania), se utiliza como medio líquido de cultivo bacteriano. Para su preparación se pesaron 30 g de TSB en 1 L de agua destilada, se homogenizó y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Para la preparación del agar tripticasa de soja (TSA, del inglés 'tryptic soy agar') (Merck), se pesaron 40 g en 1 L de agua destilada, se llevó a ebullición y se esterilizó como se ha indicado para el TSB. Para preparar el agua de peptona (Merck), utilizada principalmente para realizar las diluciones de las suspensiones bacterianas, se pesaron 10 g en 1 L de agua destilada y se esterilizó como se ha indicado anteriormente. El extracto de levadura (YE, del inglés 'yeast extract') (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), utilizado para favorecer un crecimiento más rápido del microorganismo, se añadió a los medios líquido y sólido al 0,6% (p/v).

5.6. Ensayos de actividad antimicrobiana frente a *Cronobacter sakazakii*

A partir de la lactoferrina bovina comercial, y la lactadherina y mucina bovinas aisladas como se ha descrito anteriormente, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones. En el caso de la lactoferrina se prepararon soluciones de 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL; para la lactadherina de 0,25; 0,5; 1 y 2 mg/mL y para la mucina de 0,1; 0,25; 0,5 y 1 mg/mL. Todas las soluciones de proteína se prepararon en agua de peptona al 0,1%.

Para preparar la suspensión bacteriana se partió de una colonia de *C. sakazakii* incubada en 10 mL de TSB a 37°C durante 24 h, realizándose diluciones decimales seriadas en agua de peptona, hasta lograr una concentración final de 10^4 UFC/mL.

El ensayo antimicrobiano se realizó en una placa de 96 pocillos, se añadieron 100 µL de la suspensión de *C. sakazakii* y 100 µL por pocillo de las soluciones de lactoferrina o mucina. Para el ensayo de actividad de la lactadherina y debido a la pequeña cantidad de proteína pura obtenida, se añadieron 50 µL de la suspensión de *C. sakazakii* y 50 µL de la solución de proteína. En todos los ensayos se incluyeron pocillos control, en los que solo se añadió agua de peptona al 0,1% y suspensión bacteriana. Todas las muestras

se incluyeron por duplicado y se hicieron dos series idénticas de muestras, para la extracción a dos tiempos de incubación (4 y 24 h).

Las placas se incubaron a 37°C y pasadas 4 y 24 h desde la preparación se extrajo un volumen de 100 µL de las diferentes muestras contenidas en los pocillos. A las 4 h se hicieron diluciones de hasta la 10⁻³ para el control y las concentraciones de 0,5, 1 y 2 mg/mL, en el caso de la lactoferrina, y hasta la 10⁻² para las concentraciones de 5 y 10 mg/mL. En el caso de la lactadherina, se hicieron diluciones hasta la 10⁻³ para el control y las concentraciones de 0,25 y 0,5 mg/mL, y hasta la 10⁻² para las concentraciones de 1 y 2 mg/mL. Y por último, en el caso de la mucina hasta la 10⁻³ para el control, 10⁻² para las concentraciones 0,1, 0,25 mg/mL, y hasta la 10⁻¹ para la 0,5 y 1 mg/mL. Todas las diluciones de las muestras se analizaron por duplicado. A continuación, se sembraron por duplicado 50 µL de dos de las últimas diluciones realizadas. Una vez sembradas las placas se incubaron a 37°C y se realizó el recuento de colonias a las 24 h.

A las 24 h de incubación de la placa del ensayo, se hicieron diluciones seriadas por duplicado hasta la 10⁻⁶ a partir de todas las concentraciones de lactoferrina y mucina. Se sembraron 50 µL de las dos últimas diluciones en una placa de TSA por duplicado. Transcurridas las 24 h de incubación a 37°C se realizó el recuento de las colonias.

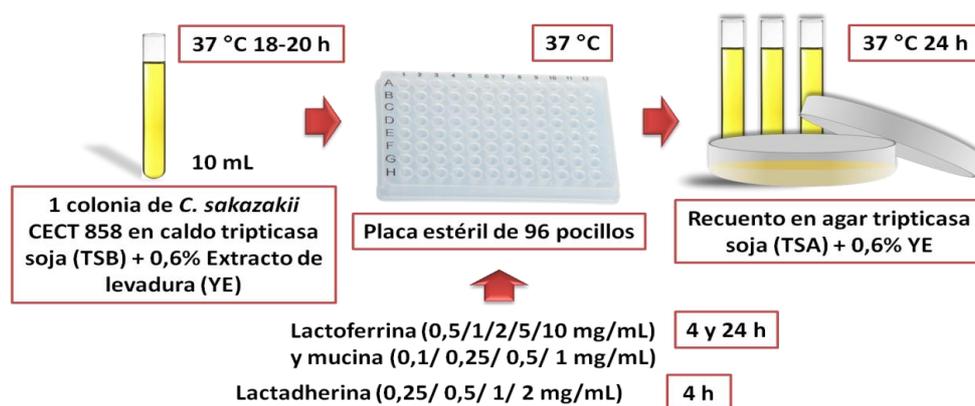


Figura 7. Etapas principales del ensayo de actividad antimicrobiana de las diferentes proteínas lácteas bioactivas frente a *Cronobacter sakazakii*.

5.7. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína de las diferentes soluciones se llevó a cabo mediante un ensayo de ácido bicinonínico (BCA bicinchoninic acid), utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Primero, se prepararon estándares de albúmina sérica bovina (BSA) de 2 a 0,06 mg/mL. A continuación, se añadieron 20 µL de los estándares y de las muestras, por duplicado, en una placa de 96

pocillos. Luego, se añadió la solución de BCA en una cantidad de 200 μ L por pocillo, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Por último, se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia). La concentración de proteína en las muestras se determinó por interpolación en la recta de calibrado obtenida con los valores correspondiente a los estándares de BSA.

5.8. Inmunodifusión doble

Para realizar la inmunodifusión doble, se preparó un portaobjetos con una primera capa de agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) con agua destilada al 0,8%. Sobre ella, se colocaron 6 mL aproximadamente de agarosa al 1,5% en tampón 5,5-dietil barbital sódico 0,03 M con NaCl 0,1 M, pH 7,4. Una vez solidificada la agarosa, se perforaron los pocillos con una plantilla y se añadieron 7 μ L/pocillo de cada muestra. En el pocillo central se colocó el antisuero antilactoferrina o antilactoperoxidasa, y en los pocillos de alrededor una solución de lactoferrina bovina de 2 mg/mL, lactoperoxidasa 1 mg/mL, y las fracciones eluidas en la purificación de la lactoferrina mediante el filtro Sartobind-75 con soluciones de NaCl 0,2 M, 0,5 M y 1 M.

5.9. Immunodotting

Para comprobar si la lactoferrina mantenía la biotina unida a la molécula, se realizó un immunodotting. En una membrana de nitrocelulosa se colocaron las muestras, añadiendo 1 μ L de muestra que se dejó secar durante 2-3 min. Dicha membrana se incubó con una solución de ovoalbúmina al 5% (p/v) y se dejó en agitación durante 1 h. Durante este tiempo, se preparó el complejo ABC del kit comercial ABC Peroxidase Staining Kit (ThermoFisher Scientific), añadiendo 1 gota del reactivo A de avidina en 5 mL de PBS y 1 gota del reactivo B de peroxidasa biotinilada, se mezcló la solución y se dejó incubar durante 30 min.

Una vez transcurrida la incubación con la ovoalbúmina se realizaron 5 lavados con suero salino fisiológico (SSF) compuesto por NaCl 150 mM, K_2HPO_4 8,38 mM y KH_2PO_4 1,54 mM, y se le añadió el complejo ABC dejándolo incubar durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron 5 lavados con SSF y se añadió el sustrato compuesto por 6 mg de 4-cloro-1-naftol en 2 mL de metanol, 8 mL de PBS y 10 μ L de H_2O_2 al 30%. Para finalizar, la reacción se detuvo con agua milli-Q.

5.10. Técnica de Inmunocap-Estreptavidina

Esta técnica es una herramienta preparada para acoplar extractos de alérgenos/

antígenos biotinilados. Con este ensayo se puede detectar la presencia de IgE frente a proteínas alergénicas en sueros de pacientes. En nuestro estudio se evaluó la alergenicidad a diferentes proteínas, como la caseína y la lactoferrina, utilizando sueros de 21 niños (de entre 3 a 12 meses de edad) alérgicos a la leche, donados por el Servicio de Alergología del Hospital Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Para realizar dicho ensayo se utilizó el kit comercial de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las instrucciones del equipo Phadia 100 (ThermoFisher Scientific) para un solo reactivo biotinilado. Para ello, se añadieron 50 μL de los sueros a cada pocillo, de forma manual. Se evaluó la reactividad de los sueros frente a la caseína biotinilada comercial, y también frente a la lactoferrina bovina biotinilada, preparada en nuestro laboratorio a una concentración de 1 mg/mL.

5.11. Cultivo celular

5.11.1. Cultivo y mantenimiento celular

La línea celular utilizada fue el clon TC7 de la línea Caco-2, procedente de un carcinoma de colon humano. Esta línea fue donada por el Área de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Las células se cultivaron en frascos de 25 cm^2 (F₂₅) con DMEM completo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel) suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA) al 1% (v/v), suero fetal bovino al 20% (v/v), L-glutamina 2 mM, y penicilina-estreptomicina al 1% (v/v) (100 unidades/mL y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). Los frascos se mantuvieron en un incubador (Heraeus, Hanau, Alemania) a 37 °C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO₂ y 95% de aire.

Para el mantenimiento celular, se retiró el DMEM completo y se lavó la monocapa celular con 5 mL de DMEM sin suplementar. Posteriormente, se retiró el medio y se añadieron 5 mL de tripsina que fue repartida por toda la superficie de la monocapa. Se dejaron 0,5 mL de tripsina en el interior del frasco y se incubó a 37°C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se desprendieron las células de la superficie del plástico y se inactivó la tripsina añadiendo 2 mL de DMEM completo, resuspendiendo las células para evitar su agregación. A continuación, se cogieron 10 μL de la suspensión celular para proceder al recuento celular en la cámara de Thoma en un microscopio invertido TMS (Nikon, Tokio, Japón). Para el mantenimiento de la línea Caco-2/TC7, la densidad final de siembra de las células en los frascos de 25 cm^2 fue de $2,5 \times 10^4$ células/ cm^2 .

Todo el proceso de cultivo celular se llevó a cabo en un ambiente estéril en una campana de flujo laminar Telstar Bio II Advance (ThermoFisher Scientific).

5.11.2. Cultivo celular en placas de 6, 24 y 96 pocillos

Tras la tripsinización descrita anteriormente, se procedió a añadir DMEM completo a la suspensión celular para conseguir una densidad aproximada de $1,4 \times 10^4$ células/cm² en las placas de 6, 24 y 96 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza). El cambio de medio se realizó cada 4 días, y las células se utilizaron para los distintos tipos de ensayos a los 15-17 días de crecimiento, cuando estaban diferenciadas en enterocitos.

5.12. Evaluación de la citotoxicidad

Una vez realizada la incubación de las células Caco-2/TC7, cultivadas en placas de 96 pocillos tras 15-17 días de crecimiento, se sometieron a un ensayo de citotoxicidad con el kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Dicho kit utiliza un compuesto denominado MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) para determinar el número de células viables con actividad metabólica y en proliferación. Las células se sometieron a dos tipos de ensayos, primero con lactoferrina y sin bacteria, y segundo con lactoferrina y con bacteria. El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra en dos experimentos independientes.

En primer lugar, se eliminó el medio de cultivo presente en la placa y se lavó con 200 µL/pocillo de PBS estéril. Se añadieron 200 µL/pocillo de DMEM básico y la placa se incubó a 37°C durante 2 h. A continuación se lavó con 200 µL/pocillo de PBS estéril y se adicionaron 50 µL/pocillo de las distintas concentraciones de lactoferrina, 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL, un control negativo sin lactoferrina, y un control positivo de citotoxicidad con H₂O₂ 50 mM, incubando la placa a 37°C durante 1 h. En el caso del ensayo con *C. sakazakii*, transcurrida la hora con la lactoferrina, se lavó con 200 µL/pocillo de PBS estéril y se añadió *C. sakazakii* a una concentración de 4 u.log. La placa se incubó durante 4 h a 37°C y transcurrido este tiempo se lavó con 200 µL/pocillo de PBS estéril. Se añadieron 200 µL/pocillo de gentamicina a una concentración de 150 µg/mL y se incubó durante 2 h a 37°C. Se retiró la gentamicina y se lavó la placa con 200 µL/pocillo con PBS estéril. Para ambos ensayos, con y sin bacteria, tras la incubación pertinente, la placa se lavó con 200 µL/pocillo de PBS estéril y se adicionaron 200 µL/pocillo de DMEM básico y 20 µL/pocillo de MTS, se incubó a 37°C durante 2 h y se

realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm.

5.13. Ensayo de inhibición de la adhesión bacteriana

Los ensayos de inhibición de la adhesión se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos con las células Caco-2/TC7 cultivadas durante 15-17 días. Primero, se eliminó el medio de los pocillos y la monocapa se lavó con 2 mL/pocillo de PBS estéril, añadiendo 2 mL/pocillo de DMEM con 1% de glutamina y 1% de NEAA, sin suero fetal bovino ni antibióticos (medio que llamaremos DMEM básico) e incubando la placa durante 2 h a 37°C. A continuación, los pocillos se lavaron con 2 mL/pocillo de PBS y se les adicionó un volumen de 150 µL de lactoferrina bovina a diferentes concentraciones (0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL) por duplicado, y la placa se incubó durante 1 h a 37°C. Transcurrido dicho tiempo, se eliminó la lactoferrina de los pocillos y se lavaron con 2 mL/pocillo de PBS. A continuación, se adicionaron 150 µL de DMEM básico y 50 µL de la suspensión bacteriana con una concentración de *C. sakazakii* de 10^4 UFC/mL por pocillo y la placa se incubó durante 4 h a 37°C. A continuación, se lavó el pocillo con 2 mL/pocillo de PBS y se adicionaron 200 µL/pocillo de gentamicina a una concentración de 150 µg/mL para inactivar las bacterias que no se habían internalizado en las células. Se hizo un lavado con 2 mL/pocillo de PBS y se adicionaron 200 µL/pocillo de tripsina incubando la placa a 37°C durante 15 min para favorecer la solubilización de las células y la consiguiente liberación de las bacterias internalizadas. Por último, se procedió a la siembra de las suspensiones procedentes de cada pocillo en placas de TSA, sembrando por duplicado cada muestra directamente del pocillo y una dilución 10^{-2} en agua de peptona al 0,1%. Se sembraron 50 µL por placa, se extendieron con un asa de Digralski, y se incubaron durante 24 h a 37°C para realizar el recuento de colonias.

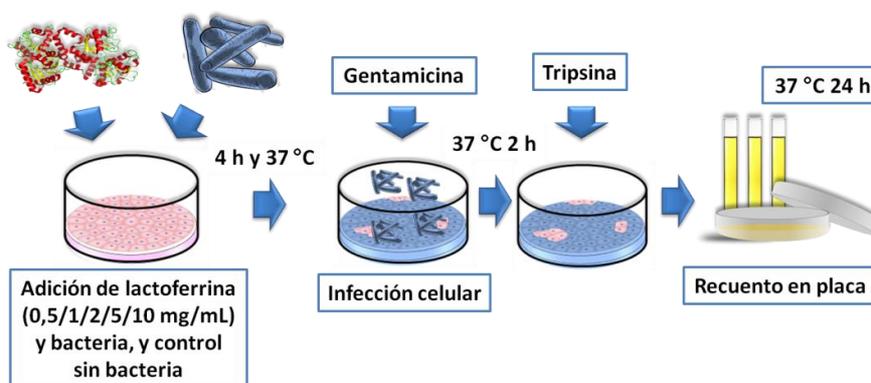


Figura 8. Etapas principales del ensayo de inhibición de la adhesión bacteriana, en las que se observan los diferentes tiempos y temperaturas de incubación, indicando las concentraciones de proteína y bacteria, así como los reactivos utilizados.

5.14. Determinación del estrés oxidativo

Los ensayos de estrés oxidativo se llevaron a cabo en las células Caco-2/TC7 cultivadas entre 15 y 17 días en placas de 6 pocillos, tras seguir el procedimiento del ensayo de la inhibición de la adhesión de *C. sakazakii* a las células. El ensayo se realizó por duplicado para cada muestra y en dos ensayos independientes en días diferentes. Se incluyó un pocillo control sin proteína ni bacteria, y otro control sin proteína y con bacteria, así como las concentraciones de 0,5 y 10 mg/mL de lactoferrina bovina. Este ensayo consta de varias etapas que se describen a continuación.

5.14.1. Preparación de homogenados celulares

Tras el cultivo de las células con las concentraciones de proteína a ensayar y la cantidad indicada de bacteria, se procedió a obtener la preparación de los homogenados celulares. Para ello, se lavó la monocapa celular dos veces con 4 mL/pocillo de PBS para eliminar el medio, manteniendo la placa siempre en hielo para evitar degradaciones. Se adicionaron 200 μ L del tampón Tris-Manitol sobre las células y se desprendieron con un raspador ejerciendo una presión suave de arriba a abajo, sumergiendo el raspador en el tampón Tris-Manitol contenido en el pocillo y dando pequeños golpes en la placa entre cada arrastre. Se aspiró el raspado con una micropipeta y se llevó a un potter de vidrio, recuperando todas las células del pocillo con un volumen adicional de 133 μ L del mismo tampón. Con el potter se realizaron 20 movimientos ascendentes y descendentes con giro de la varilla y se vertió el contenido en un falcon de 15 mL manteniéndolo en hielo picado. Posteriormente, se adicionaron 66,6 μ L de tampón Tris-Manitol sobre la varilla y se realizaron 10 movimientos, vertiendo el contenido final en el mismo falcon. A continuación, el contenido se llevó a un sonicador modelo Bandelin Sonopuls (Bandelin Electronics, Berlín, Alemania) con el que se aplicaron 10 pulsos seguidos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras sonicadas, a 3.000 x g durante 10 min a 4°C, para eliminar el contenido nuclear. Se recogió el sobrenadante correspondiente al homogenado celular sobre el que se realizaron posteriormente la cuantificación de proteína y las determinaciones de la oxidación de lípidos y proteínas.

5.14.2. Determinación del estrés oxidativo en lípidos: cuantificación de MDA + 4-HDA

En primer lugar, se prepararon unos estándares por duplicado para construir una recta

patrón que permitiera la interpolación de los resultados obtenidos de las muestras a ensayar. Para realizar esta recta se utilizaron viales eppendorf de 1,5 mL en los que se añadieron los reactivos en el orden y las cantidades descritas a continuación. Primero, el reactivo S1 diluido, compuesto por 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich), un análogo del malonaldehído (MDA), diluido en Tris 50 mM pH 7,4 en una proporción 1:100 (v/v). Por otro lado, el reactivo R1 que se obtuvo al diluir 1-metil-2-fenilindol (Sigma, St. Louis) en acetonitrilo (Panreac, Barcelona, España). El reactivo R1/metanol, se preparó siguiendo siempre una proporción 3:1 (v/v). Y por último, el reactivo R2 constituido por ácido metanilsulfónico puro (Sigma, St. Louis).

Tabla 3. Volúmenes utilizados para la recta patrón del ensayo de estrés de lípidos que se añadieron en el orden indicado.

S1 diluido (µL)	Tris 50mM (µL)	R1/Metanol (µL)	R2 (µL)
0	60	195	45
0,4	59,6	195	45
1	59	195	45
4	56	195	45
6	54	195	45
10	50	195	45
14	46	195	45

Paralelamente, se prepararon las muestras por duplicado, añadiendo el reactivo R1/Metanol, y seguidamente el reactivo R2, según los volúmenes y orden de la Tabla 4. Después de añadir cada reactivo, se agitaron las muestras con vórtex.

Tabla 4. Volúmenes utilizados para las muestras del ensayo de estrés de lípidos siguiendo el orden de adición.

Muestra (µL)	Tris 50mM (µL)	R1/Metanol (µL)	R2 (µL)
60	-	195	45

Posteriormente, se incubaron las muestras y los estándares a 45°C durante 40 min en baño termostático, y se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 min a 4°C, recogiendo el sobrenadante. Las muestras se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente, y se pasaron a una placa de 96 pocillos para medir la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro modelo Spectrostar nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania).

5.14.3. Determinación del contenido en proteínas: método Bradford

En primer lugar y al igual que en la prueba anterior, se realizó una recta patrón con los estándares por duplicado, utilizando viales eppendorf de 1,5 mL para su preparación. Se añadieron los volúmenes descritos en la Tabla 5, utilizando los siguientes reactivos: BSA (Sigma-Aldrich) a 1 mg/mL en tampón Tris-Manitol pH 7,4 y reactivo Bradford compuesto por 2,5 mL de 96% de etanol, 5 mg de Azul de Coomassie G-250, y 5 mL de ácido ortofosfórico.

Tabla 5. Volúmenes utilizados para el ensayo de determinación de la concentración de proteína.

BSA (μ L)	Tris-Manitol (μ L)	Bradford (mL)
0	20	1
2	18	1
5	15	1
10	10	1
15	5	1

Para la preparación de las muestras se adicionaron 5 μ L de la muestra, 15 μ L de Tris-Manitol y 1 mL del reactivo de Bradford. Se homogenizaron mediante vórtex y se dejaron en reposo durante 5 min. A continuación, se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína de las muestras se determinó interpolando los valores de la absorbancia en la recta patrón.

5.14.4. Determinación del estrés oxidativo en proteínas: cuantificación de carbonilos

Para comenzar esta prueba es necesario calcular a partir del ensayo de Bradford el volumen de muestra a adicionar para tener una concentración de 0,5 mg/mL de proteína. El ensayo se realizó por triplicado. En primer lugar, se tomaron 25 μ L del homogenado de las muestras, y se le añadieron 275 μ L de tampón Tris-Manitol 50 mM, pH 7,4; 50 μ L de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM (Sigma, St. Louis) diluida en HCl 2 N y se incubaron a 37°C durante 1 h. Tras la incubación, las muestras se introdujeron rápidamente en hielo picado y se homogeneizaron con un vórtex. Se añadieron 81,25 μ L de ácido tricloroacético (TCA) (VWR, Leuven, Bélgica) al 50% conservado en frío, la mezcla se agitó con vórtex y se mantuvo en hielo durante 10 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4.000 x g durante 10 min a 4°C, se lavó el precipitado con 250 μ L de etanol/etilacetato (Sigma, St. Louis) 1:1 (v/v) y se resuspendió el precipitado.

Se realizaron 4 centrifugaciones sucesivas a 3.000 x g durante 3 min a 4°C, excluyendo el sobrenadante, lavando el precipitado con 250 µL de etanol/etilacetato (1:1) y resuspendiéndolo con la micropipeta. Tras este proceso, el precipitado se disolvió en 175 µL de guanidina 6 M-HCl pH 2 (Sigma, St. Louis) y se incubó a 37°C durante 15 min. Después, se centrifugaron las muestras a 12.000 x g durante 10 min a 4°C, se colocaron en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 375 nm en un equipo Spectrostar nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania). La concentración de carbonilos se calculó mediante la ley de Beer-Lambert:

$$\begin{aligned} \varepsilon &= 22.00/\text{M} = 22.000/10^6 \text{ nmol/ml} & \text{Absorbancia} &= l \cdot c \cdot \varepsilon \\ c &= \text{Abs}/\varepsilon = \text{Abs}/22.000/10^6 \\ c &= \text{Abs} \times 45,45 \text{ nmol/mL} \end{aligned}$$

5.15. Expresión de receptores TLR2 y TLR4 mediante RT-PCR

Para analizar la expresión de receptores intestinales se cultivaron las células Caco-2/TC7 de 15 a 17 días en una placa de 24 pocillos. Los pocillos seleccionados siguieron el mismo procedimiento que el seguido en los ensayos de inhibición de la adhesión con *C. sakazakii*, evaluando las siguientes muestras: un control sin LFb ni *C. sakazakii*, un control sin LFb y con *C. sakazakii*, dos pocillos con 0,5 y 10 mg/mL de LFb, y dos pocillos con 30 y 60 µg/mL de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich). Primero, se extrajo el RNAm de las células, se obtuvo el DNA complementario mediante la acción de la retrotranscriptasa inversa (RT transcriptase) y posteriormente, se amplificó el DNA obtenido con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR).

5.15.1. Extracción del RNA

Para la extracción del RNA se utilizó el mini kit RNeasy de QIAGEN (Venlo, Países Bajos). Tras la incubación de 2 h con gentamicina y previo lavado de PBS siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se procedió a la lisis celular con 350 µL del tampón RLT con 10 µL de 2- mercaptoetanol por pocillo, la mezcla se trasladó a un vial eppendorf de 0,5 mL y se homogeneizó con vórtex durante 1 min. Se adicionaron 350 µL de etanol al 70% y se transfirieron los volúmenes a las columnas de RNeasy. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 15 s a 11.000 x g, descartándose el eluido. A cada columna, se le adicionaron 700 µL del tampón RW1 y se centrifugaron 15 s a 11.000 x g descartando nuevamente el eluido. Seguidamente, se adicionaron 500

μL del tampón RPE y se centrifugó durante 15 s a 11.000 x g descartando el eluido. Se volvieron a adicionar 500 μL del tampón RPE y se centrifugó durante 2 min a 11.000 x g, descartando el eluido. Luego, se centrifugó durante 1 min a 13.000 x g para proceder al secado de la columna. Se cambió la columna por un eppendorf de 1,5 mL y se adicionaron 40 μL de agua libre de RNAsas. Se centrifugó durante 1 min a 11.000 x g, y se guardó el RNA eluido a -80°C hasta su uso.

5.15.2. Obtención del DNA

Para la obtención del cDNA del RNA mensajero de las células, se utilizó el kit qScript cDNA SuperMix (QuantaBio, Beverly, MA, EE. UU.). Primero, se analizó la cantidad de mRNA de cada muestras en $\text{ng}/\mu\text{L}$ con ayuda del Nanodrop (ThermoFisher), obteniendo valores próximos a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$. A continuación, manteniendo las muestras y la mezcla en hielo, se añadieron 4 μL de qScript cDNA SuperMix (5X) y se calculó la cantidad de muestra y de agua libre de RNAsas/ DNAsas necesaria para conseguir un volumen final de 20 μL por muestra. A continuación, las muestras se llevaron a un termociclador modelo Alpha Unit Block Assembly for DNA Engine Systems (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) y se incubaron en las siguientes etapas: 25°C durante 5 min, 42°C durante 30 min y a 85°C durante 5 min, conservándose a -20°C hasta su posterior uso.

5.15.3. PCR a tiempo real

Una vez obtenido el cDNA, se amplificó con una PCR a tiempo real. En este caso, se tuvieron en cuenta la expresión de cuatro genes de interés: TLR2, TLR4, GADPH, HPRT1. Estos dos últimos genes son genes control o “housekeeping”. En primer lugar, se preparó un mix que contenía 0,5 μL de los *primers forward* y *reverse*, 10 μL de Sybr Green, y 7 μL de agua libre de RNAsas, por muestra. En una placa de 48 pocillos se adicionaron 18 μL de esta mezcla y 2 μL de la muestra de DNA diluida 1/5 en agua libre de RNAsas por pocillo y se introdujo en un equipo de qPCR Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Los ciclos umbrales (Ct) obtenidos se analizaron estadísticamente restando a los Ct de cada muestra correspondientes a la amplificación de los genes TLR2 y TLR4 la media de los valores Ct correspondientes a los genes GADPH y HPRT1. Al valor obtenido se le restó la media de los valores de los controles negativos. El resultado final se expresó en relación a los valores de Ct de los controles.

5.16. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados en este Trabajo Fin de Máster se ha realizado utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

La normalidad de los datos se comprobó con el test de Saphiro-Wilk. Los datos que no seguían una distribución normal se sometieron al test de Man-Whitney, determinando que los datos obtenidos no se debían al azar. Para comprobar si las diferencias entre las medias eran significativas, se realizó un análisis de varianza ANOVA con una prueba posterior que permitiera determinar qué medias difieren entre sí. Por último, se utilizó la prueba post hoc de Tukey y se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor $p \leq 0,05$. Para indicar las diferencias significativas, se han utilizado asteriscos (*) en las gráficas de los resultados.

6. Resultados y discusión

6.1. Aislamiento de lactadherina

La lactadherina se aisló a partir de leche bovina siguiendo el protocolo de Kim *et al.* (1992). La cromatografía de Sephacryl S- 200 High Resolution dio lugar a dos picos principales, eluyendo la lactadherina en mayor proporción en el primero de ellos. El aislamiento mediante filtración en gel permite eliminar la mayor parte de proteínas contaminantes, pero tal y como se muestra en la electroforesis (figura 9B), en este caso no se logró su eliminación por completo. A esta fracción obtenida se le denominó fracción enriquecida en lactadherina, debido a que existen pequeñas cantidades de otras proteínas (Kim *et al.*, 1992). Los subproductos lácteos como la leche descremada, el suero de mantequilla y el suero de leche constituyen una excelente fuente para aislar la lactadherina con el objetivo de agregarla a productos funcionales (Ripollés *et al.*, 2018).

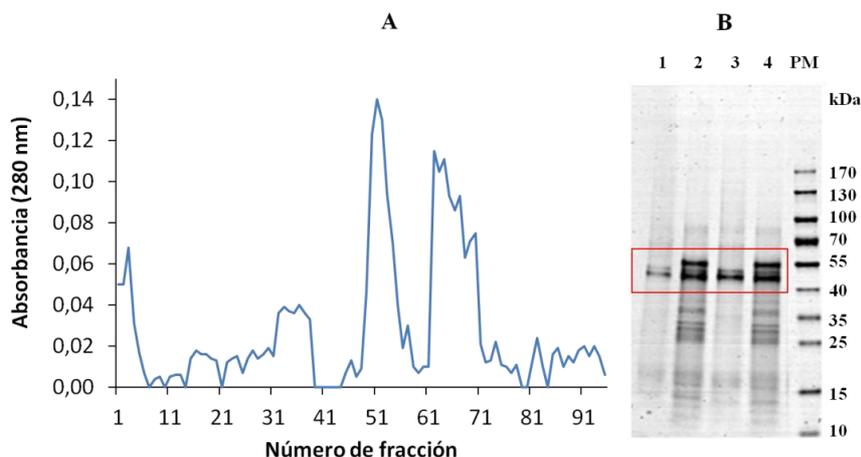


Figura 9. (A) Perfil cromatográfico en Sephacryl S-200 High Resolution de la fracción obtenida de la membrana del glóbulo graso. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 1,2 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4- 20 %) de las fracciones de la cromatografía teñidas con Azul de Coomassie. (1, 3) Fracción 51-60 concentrada, (2, 4) fracción 61-71 concentrada. PM: marcador de pesos moleculares. Las bandas correspondientes a la lactadherina aparecen recuadradas en rojo.

6.2. Aislamiento de mucina

El aislamiento de mucina se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Gallier *et al.* (2012) y Le *et al.* (2012). La fracción de butterserum tras la hidrólisis con pepsina porcina se aplicó a una columna Sepharose CL-2B siguiendo el protocolo de Kodama y Kimura (2001), y obteniendo el perfil cromatográfico que se muestra a continuación (figura 10A).

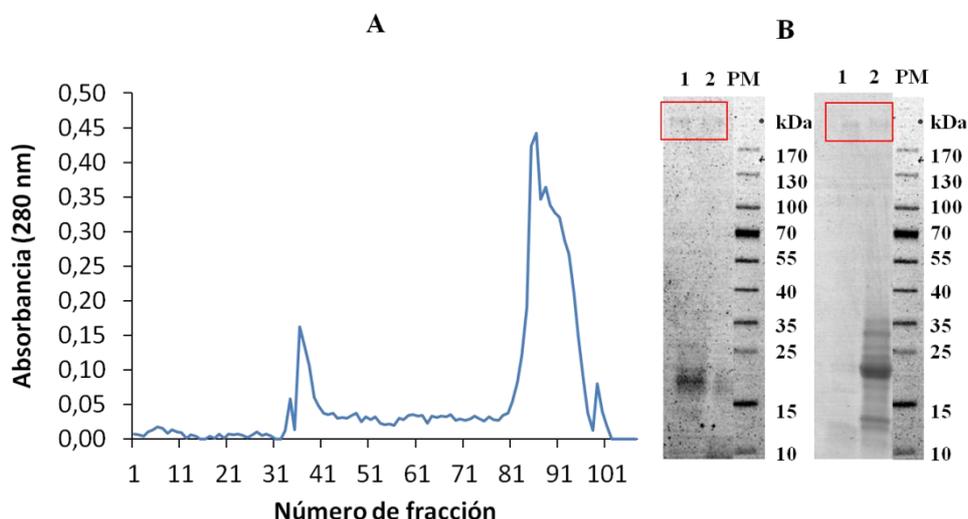


Figura 10. (A) Perfil cromatográfico en Sepharose CL-2B de la fracción concentrada del hidrolizado de butterserum con pepsina bovina. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 3 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) de las fracciones obtenidas, teñidas con PAS (izquierda) y Azul de Coomassie (derecha). PM: marcador de pesos moleculares. (1) Fracción 34-40 concentrada y (2) fracción 84-98 concentrada. Las bandas correspondientes a las mucinas aparecen recuadradas en rojo.

Como se puede observar en la cromatografía, se evidencia un pico principal, que corresponde a la mucina, y varios pequeños picos anteriores correspondientes a restos de mucina agregados. Según Devaraj *et al.* (1992), la mucina es una proteína difícil de purificar porque tiene una fuerte tendencia a interactuar con componentes como proteínas no glicosiladas, glicoproteínas séricas y también a autoagregarse.

En la electroforesis (Figura 10B) se puede observar, a una parte de la mucina con un alto peso molecular (>200 kDa) y varias fracciones con pesos moleculares inferiores. Puesto que estas últimas bandas se tiñen con tinción PAS y apenas con tinción Coomassie podría deducirse que la mucina ha liberado pequeños fragmentos, en el proceso de la digestión con la pepsina, que mantienen unidos los glicanos (Holden *et al.*, 1971). Se puede considerar que en este Trabajo de Fin de Máster se ha logrado el aislamiento de mucina con un alto grado de pureza y con un buen rendimiento.

6.3. Purificación de la lactoferrina bovina comercial

La lactoferrina se purificó a partir de la lactoferrina comercial de Tatua Nutritionals, utilizando un filtro derivatizado con grupos sulfónicos y realizando varias eluciones con diferentes concentraciones de NaCl 0,2 M, 0,5 M, 1 M y 2 M.

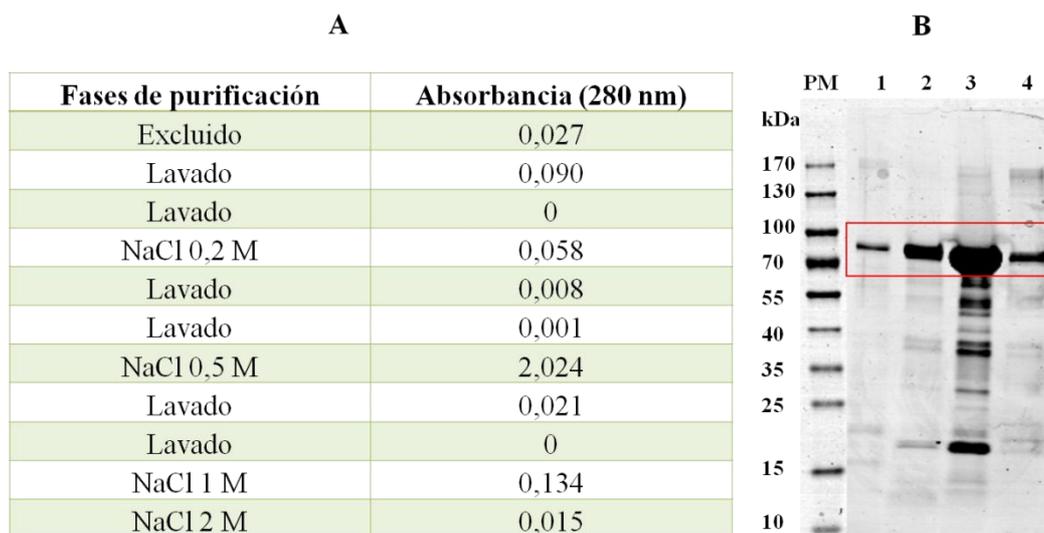


Figura 11. (A) Tabla con las diferentes absorbancias de las distintas etapas de elución del proceso de purificación de lactoferrina bovina con el filtro Sartobind-75. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20 %) de las fracciones obtenidas, teñida con Azul de Coomassie. PM: marcador de pesos moleculares. (1) Excluido, (2) NaCl 0,2 M, (3) NaCl 0,5 M, (4) NaCl 1 M. La banda correspondiente a la lactoferrina aparece recuadrada en rojo.

Tal y como se observa en la electroforesis (Figura 11B), la lactoferrina eluyó principalmente con la concentración de NaCl 0,5 M, pero con una alta cantidad de proteínas contaminantes. La banda principal obtenida en la elución con NaCl 0,2 M

podría corresponder con la lactoperoxidasa, dado que es la otra proteína básica del lactosuero, con un punto isoeléctrico similar al de la lactoferrina. Al utilizar una concentración salina baja, las proteínas con carácter ácido o básico débil se eluyen con mayor facilidad. La lactoferrina es una proteína altamente básica por lo que necesita una concentración salina superior para una correcta elución (Adlerova, Bartoskova y Faldyna 2008); por ello se observa mayor cantidad de lactoferrina a mayor concentración de NaCl. Para la biotinilación se utilizó la fracción eluida con NaCl 1 M.

6.4. Comprobación de la pureza de la lactoferrina bovina mediante la técnica de inmunodifusión doble

Se realizó un ensayo de inmunodifusión doble para comprobar la presencia de lactoferrina y lactoperoxidasa en las fracciones eluidas del filtro derivatizado con grupos sulfónicos. Se utilizaron dos controles positivos, lactoferrina bovina a una concentración de 2 mg/mL (figura 12A) y lactoperoxidasa bovina a 1 mg/mL (Figura 12B).



Figura 12. Ensayo de inmunodifusión doble para (A) lactoferrina bovina nativa (LF) y (B) lactoperoxidasa bovina (LP). (1) C+: LF 2 mg/mL (A), LP 1 mg/mL (B), (2) fracción excluida del proceso de purificación, (3) fracción eluida con NaCl 0,2 M, (4) fracción eluida con NaCl 0,5 M, (5-6) fracción eluida con NaCl 1 M, (7) antisuero anti-lactoferrina bovina y (8) antisuero anti-lactoperoxidasa bovina.

Tal y como se observa en la Figura 12A, todas las muestras estudiadas fueron positivas para la lactoferrina, y negativas para la lactoperoxidasa (Figura 12B). Esto confirma que las muestras de lactoferrina purificada no tenían presencia de lactoperoxidasa, que posiblemente se encuentra en la fracción de excluido en una concentración baja que no permite su visualización en el precipitado correspondiente a ese pocillo.

6.5. Evaluación de los sueros de niños alérgicos a la leche mediante la técnica de ImmunoCAP-Streptavidin

Para la evaluación de la alergenicidad de la lactoferrina se utilizaron 10 sueros de niños alérgicos a la leche, donados por el Hospital Lozano Blesa Universitario de Zaragoza.

Se analizaron dos parámetros diferentes: la presencia de IgE frente a caseína bovina biotinilada comercial como control de la reacción, y la presencia de IgE frente a la lactoferrina biotinilada en este trabajo.

Tabla 6. Valores de referencia para la detección de alergias, expresados en el valor normal de IgE específica medido en kU/L o U/mL (Sociedad Española de Inmunología Clínica, Alergología y Asma Pediátrica, Barcelona).

Niveles de IgE específicas		
kU/L o U/mL	Clase	Interpretación
Menos de 0,35	0	Normales o negativos
0,35 a 0,70	1	Positivos, mínimos
0,70 a 3,5	2	Positivos, bajos a intermedios
3,5 a 17,5	3	Positivos, intermedios a altos
17,5 a 50	4	Positivos, altos
50 a 100	5	Positivos, muy altos
Más de 100	6	Positivos, al máximo

Tabla 7. Valores obtenidos de la evaluación de la reactividad de sueros de niños alérgicos a la leche frente a caseína, lactoferrina (LF), alfa-lactalbúmina (α -LA) y beta-lactoglobulina (β -LB) bovinas, mediante el test Inmunocap-Streptavidin. (¹) Valores suministrados por el Hospital Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

Código paciente	IgE leche ¹ (KU/L)	IgE total ¹ (UI/mL)	IgE caseína (KU/L)	IgE LF (KU/L)	IgE α -LA ¹ (KU/L)	IgE β -LB ¹ (KU/L)
1	7,16	27	5,04	0,003	4,54	<0,1
2	18,20	345	3,83	0,140	0,93	1,52
3	3,81		<0,1	0	<0,1	<0,1
7	4,03	32,2	1,52	0,003	0,21	4,83
10	3,79	17,3	1,61	0,013	0,81	0,78
12	3,75	14	0,50	0,004	3,17	2,54
13	25,80	266	11,70	0,005	9,08	16,90
14	16,90	910	13,90	0,040	4,29	<0,1
17	-	-	25,60	0,100	-	-
19	-	-	1,50	0,010	-	-

La Tabla 6 nos indica los valores de referencia para la detección de una alergia, siendo la clase 6 la indicadora de más alergenidad, y la clase 0 la ausencia de alergia.

Tal y como se muestra en la Tabla 7, los valores de IgE frente a caseína, suministrados por el hospital, fueron significativamente más elevados, lo que coincide con la

consideración de que es una de las proteínas lácteas con mayor alergenicidad.

Según Shoormasti *et al.* (2011) la α -lactalbúmina y la caseína son las proteínas más alergénicas de la leche bovina. Estos autores también afirman que existe una mayor alergenicidad por parte de los hombres a las IgE específicas a la caseína, que las mujeres.

En nuestro estudio, tal y como se observa en la Tabla 7, no se encontró ningún suero de pacientes alérgicos con reacción positiva a la lactoferrina, por lo que su uso en leches infantiles sería segura debido a su baja alergenicidad.

6.6. Ensayos de actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii*

6.6.1. Actividad de la lactadherina bovina

La lactadherina se ensayó en las concentraciones de 0,25; 0,5; 1 y 2 mg/mL frente a una concentración inicial de *C. sakazakii* de 4 u.log. Se determinó la actividad antimicrobiana de la lactadherina frente a *C. sakazakii* mediante un recuento de colonias a las 4 h de incubación con la proteína (Figura 13).

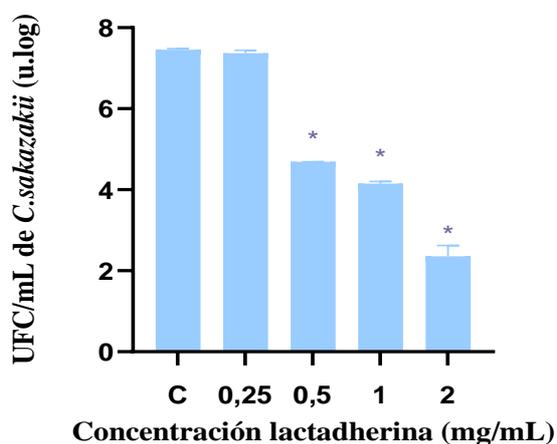


Figura 13. Ensayo de actividad antimicrobiana de lactadherina bovina a las concentraciones de 0,25; 0,5; 1 y 2 mg/mL frente a *C. sakazakii* (concentración expresada en unidades logarítmicas de UFC/mL). Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en un experimento (n = 2). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*p < 0,0001).

En este ensayo preliminar, los recuentos de *C. sakazakii* incubado con 0,5, 1 y 2 mg/mL de lactadherina disminuyeron de forma significativa con respecto al control hasta reducirse en 5 u.log en presencia de 2 mg/mL de lactadherina. Sin embargo, no se puede confirmar el efecto antimicrobiano de la lactadherina debido al escaso número de ensayos que se han podido realizar, dada la dificultad para obtener la proteína pura, por lo que sería necesario aumentar el número de experimentos. En cualquier caso, los

resultados preliminares son prometedores. Existen pocos estudios acerca de la actividad antimicrobiana de esta proteína, pero según Ji *et al.* (2017) la lactadherina participa en varios procesos reguladores mediados por la superficie celular y tiene muchas propiedades biológicas, como actividad inhibitoria de la infección por rotavirus (Parrón *et al.*, 2018).

6.6.2. Actividad de la lactoferrina bovina nativa

Se ha comparado el efecto antimicrobiano de la lactoferrina bovina nativa procedente de dos fuentes diferentes: Tatua Nutritionals (Figura 14A) y Armor VitalArmor (Figura 14B). La actividad de estas proteínas se ensayó a las concentraciones de 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL para una concentración inicial de *C. sakazakii* de 4 u.log, incluyendo también un control sin lactoferrina (Figura 14). Se determinó su actividad inhibitoria frente a *C. sakazakii* tras dos periodos de incubación, a las 4 y 24 h.

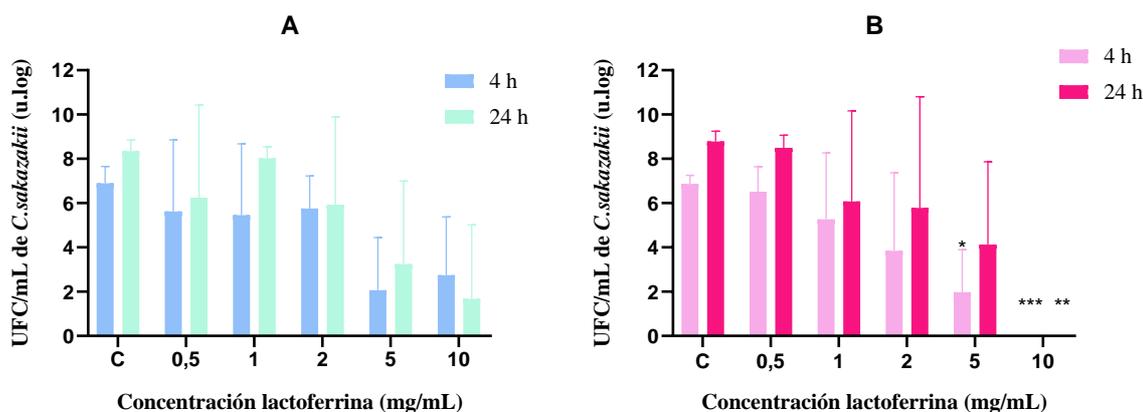


Figura 14. Ensayo de actividad antimicrobiana de lactoferrina bovina nativa Tatua Nutritionals (A) y de Armor VitalArmor (B) a las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL frente a *C. sakazakii* expresada en unidades logarítmicas a las 4 h y a las 24 h. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en cinco ensayos independientes (n = 10). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*p < 0,01, **p < 0,005, ***p < 0,0004).

En el caso de lactoferrina bovina nativa de Tatua Nutritionals (Figura 14A) a las 4 h se observa una reducción de *C. sakazakii* de hasta 4 y 3,5 u.log para la concentración de 5 y 10 mg/mL, respectivamente. Por otro lado, el efecto antibacteriano de esta lactoferrina a las 24 h se mantiene, en general, aunque a las concentraciones de 1 y 5 mg/mL se observa un ligero incremento de *C. sakazakii* con respecto a las 4 h. Sin embargo, a la concentración de 10 mg/mL se puede confirmar el efecto antimicrobiano de la lactoferrina a las 4 y a las 24 h de ensayo.

En el caso de la lactoferrina procedente de Armor VitalArmor (Figura 14B) a las 4 h, se observa una reducción significativa para las concentraciones de 5 y 10 mg/mL de 5 y 6

u.log, respectivamente. *C. sakazakii* se recupera ligeramente a las 24 h de incubación para las concentraciones de 0,5 a 5 mg/mL debido probablemente a que el efecto de la lactoferrina es bacteriostático y las bacterias se recuperan. Sin embargo, a la concentración de 10 mg/mL no se observó esta recuperación con respecto a las 4 h, lo que permite afirmar el efecto antimicrobiano de la lactoferrina, probablemente bactericida.

Comparando ambas lactoferrinas bovinas comerciales, Armor VitalArmor tendría una mayor reducción de *C. sakazakii* a las 4 y 24 h de ensayo, mostrando más diferencias significativas con respecto al control que la lactoferrina de Tatu Nutritional.

Según Embleton *et al.* (2013), la actividad antibacteriana de la lactoferrina se atribuye principalmente a su capacidad para unir el hierro libre e impedir su utilización por las bacterias. La lactoferrina también desestabiliza la membrana celular de los microorganismos, uniéndose a las porinas presentes en la superficie de las bacterias causando la liberación del LPS y aumentando la fragilidad bacteriana.

6.6.3. Actividad de la mucina bovina

La actividad antimicrobiana de la mucina se ensayó a las concentraciones de 0,11; 0,25; 0,5 y 1 mg/mL, frente a *C. sakazakii* a una concentración inicial de 4 u.log a las 4 y 24 h de incubación (Figura 15).

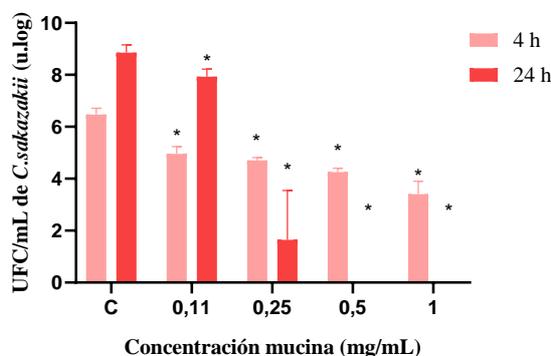


Figura 15. Ensayo de actividad antimicrobiana de mucina bovina a las concentraciones de 0,11; 0,25; 0,5 y 1 mg/mL con respecto a la concentración de *C. sakazakii* expresada en unidades logarítmicas a las 4 h (•) y a las 24 h (•). Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos diferentes (n = 4). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*p < 0,001).

La actividad antimicrobiana de la mucina a las 4 h de ensayo tiene una reducción significativa con respecto al control a las concentraciones de 0,11; 0,25; 0,5 y 1 mg/mL, disminuyendo hasta 3 u.log en el caso de 1 mg/mL. Del mismo modo, a las 24 h de ensayo, se observa un mayor efecto de la actividad antimicrobiana de la mucina, incluso

tras el aumento de la concentración del patógeno, reduciendo hasta 9 u.log en el caso de 0,5 y 1 mg/mL, inhibiendo por completo el crecimiento de *C. sakazakii* a estas concentraciones. De esta manera, se comprueba el efecto antibacteriano de la mucina. A las 24 h, la concentración de 0,11 mg/mL del antimicrobiano presenta una recuperación de la bacteria, mientras que a concentraciones superiores a ésta, el efecto antimicrobiano es mayor, inhibiendo completamente el crecimiento.

Según Sperandio *et al.* (2015), la glicosilación de las mucinas les da la capacidad de formar barreras físicas, adquiriendo funciones directas e indirectas en la defensa contra la infección microbiana. Los glicanos de mucina pueden unirse a microorganismos y en algunos casos, tienen actividad antimicrobiana directa o portan otras moléculas antimicrobianas. No es sorprendente que los patógenos microbianos hayan desarrollado estrategias específicas para frustrar la barrera mucosa.

6.7. Evaluación de la citotoxicidad

La citotoxicidad celular fue determinada a partir mediante la técnica de MTS en células Caco-2/TC7 cultivadas durante 15-17 días, determinando así su actividad metabólica. Se ensayaron las mismas concentraciones de lactoferrina bovina nativa (Figura 16A) y saturada con hierro (Figura 16B) utilizadas en los ensayos de inhibición de la adhesión bacteriana. Se comparó la viabilidad de las células tratadas únicamente con lactoferrina o tratadas con lactoferrina e infectadas con el patógeno.

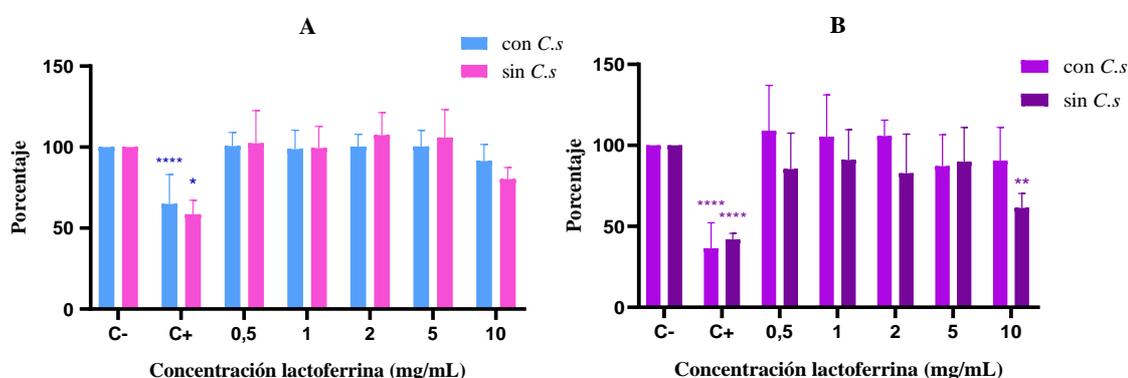


Figura 16. Determinación de la citotoxicidad de la lactoferrina bovina nativa (A) y saturada (B) a las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL en las células Caco-2/TC7, con *C. sakazakii* y sin *C. sakazakii*. C-: control de células sin patógeno ni proteína, C+: control positivo con peróxido de hidrógeno 50 mM. Los valores están expresados como porcentaje respecto del control negativo (absorbancia a 492 nm), y representan la media \pm desviación estándar de tres réplicas en tres experimentos independientes (n = 9). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (*p < 0,01, **p < 0,002, ***p < 0,0001).

La viabilidad de las células Caco-2/TC7 no se ve afectada con la adición de la lactoferrina bovina nativa. Tampoco se vio afectada dicha viabilidad tras la incubación durante 4 h a 37°C con *C. sakazakii* (Figura 16A).

Sin embargo, en el caso de la lactoferrina bovina saturada con hierro (Figura 16B) se observa un mayor carácter citotóxico con respecto a la lactoferrina nativa, encontrando diferencias significativas para la concentración de 10 mg/mL, pudiendo deberse al efecto oxidante del hierro. Se aprecia cómo tras la adición del patógeno, este carácter citotóxico disminuye, pudiendo ser debido a la capacidad de las bacterias para captar el hierro. Un mecanismo de virulencia de *C. sakazakii* es el sistema de adquisición de hierro, con el que codifica un sistema de absorción de este mineral mediado por el sideróforo activo que desempeña un papel en el transporte y la regulación del hierro, favoreciendo así a su crecimiento y proliferación (Singh, Goel y Raghav, 2015).

Según Gibbons, Kanwar y Kanwar (2015) la lactoferrina bovina se ha asociado con propiedades inmunoestimulantes y anticancerígenas en todas sus formas, pudiendo explicar la citotoxicidad de esta proteína a este tipo celular. La lactoferrina saturada con hierro en estudios realizados *in vivo* en ratones, mostró propiedades antitumorales, aumentando la citotoxicidad celular y adquiriendo así un mayor potencial terapéutico.

6.8. Inhibición de la adhesión de *C. sakazakii* a las células Caco-2/TC7

La inhibición de la adhesión de *C. sakazakii* se llevó a cabo con células Caco-2/TC7 cultivadas durante 15-17 días, añadiendo dos tipos de lactoferrina: nativa y saturada con hierro, a las concentraciones de 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL, y adicionando un control sin lactoferrina. La concentración inicial del patógeno fue de 4.uLog.

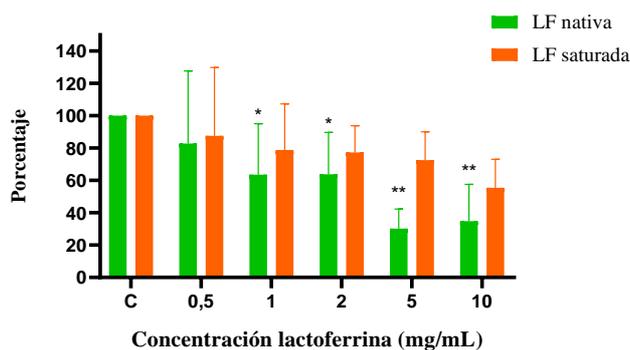


Figura 17. Ensayo de inhibición de la adhesión bacteriana de lactoferrina bovina nativa (●) y saturada con hierro (●) a las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL. Los valores se expresan como porcentaje respecto al control (UFC/mL) y representan la media ± desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos diferentes (n = 4). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*p < 0,04, **p < 0,002).

En el caso de la lactoferrina bovina nativa, las concentraciones de 1, 2, 5 y 10 mg/mL produjeron una inhibición de la adhesión bacteriana, presentando diferencias significativas con respecto al control. Las mayores reducciones fueron de aproximadamente el 70% y 60% para las concentraciones de 5 y 10 mg/mL, respectivamente, con respecto al control.

Por lo tanto, esta investigación así como la realizada por Quintero-Villegas, Wittke y Hutkins (2014) demuestran que la lactoferrina es una proteína inhibidora de la adherencia de *C. sakazakii* a las células epiteliales intestinales. Aunque la inhibición de la adhesión bacteriana parece estar mediada generalmente por la unión de lactoferrina a las superficies de las células bacterianas y del huésped, la sorprendente demostración de la actividad proteolítica de la lactoferrina humana ha proporcionado un mecanismo adicional para explicar la actividad antiadhesiva de esta proteína (Valenti y Antonini, 2005).

Por otro lado, la lactoferrina bovina saturada con hierro presenta reducciones de hasta el 40% en el caso de 10 mg/mL de proteína, pero sin presentar diferencias significativas para ninguna de las concentraciones con respecto al control. Esto puede ser debido a que la conformación de la proteína saturada es diferente y puede tener menos capacidad para bloquear los receptores de las células epiteliales para *C. sakazakii*. Según Valenti y Antonini (2005) la lactoferrina en forma apo o saturada de hierro, ejerce una actividad inhibidora contra la internalización microbiana, pero la lactoferrina saturada de hierro disminuye la agregación y el desarrollo de biofilm.

6.9. Determinación del estrés oxidativo

Para llevar a cabo el ensayo de estrés oxidativo, con el que se completó la determinación de la viabilidad celular, se cultivaron las células Caco-2/TC7 durante 15-17 días con concentraciones de lactoferrina de 0,5 y 10 mg/mL y una concentración inicial de *C. sakazakii* de 4 u.log. Con este ensayo se determinó el estrés oxidativo en la fracción de lípidos (Figura 18A) y proteínas (Figura 18B).

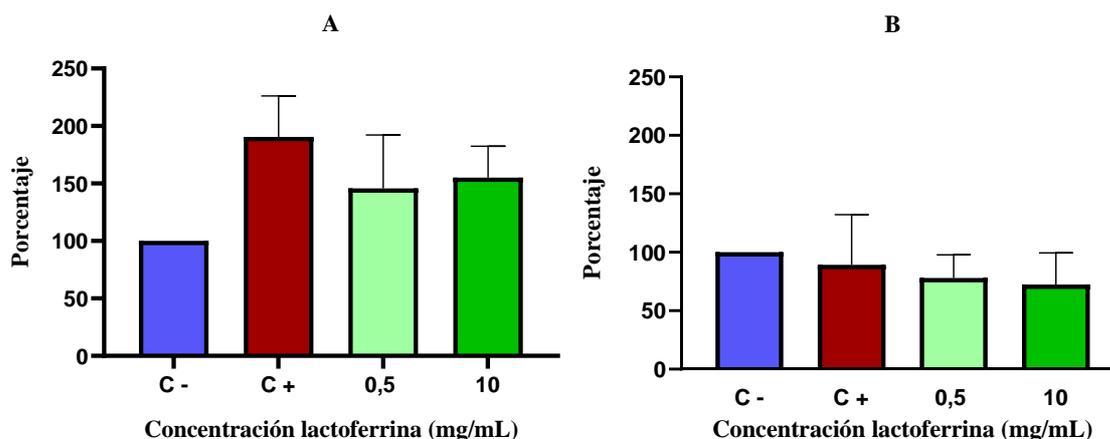


Figura 18. Determinación del estrés oxidativo en células Caco-2/TC7 tras la incubación con lactoferrina bovina nativa a las concentraciones de 0,5 y 10 mg/mL, y con una concentración de 4 u.log. de *C. sakazakii* durante 4 h. C-: control de células sin patógeno ni proteína, C+: control positivo de células tratadas únicamente con el patógeno. La determinación del estrés oxidativo en lípidos (A) y en proteínas (B) se expresan en porcentaje con respecto al control negativo. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes (n = 4).

Tal y como se observa en la Figura 18, la adición de *C. sakazakii* a las células provoca un aumento del estrés oxidativo en la fracción de lípidos. Sin embargo, este patógeno no parece influir de la misma manera sobre las proteínas, al menos en el tiempo de incubación aplicado.

De manera adicional, al añadir la lactoferrina a diferentes concentraciones se observa que este estrés en los lípidos disminuye (Figura 18A), aunque no se observan diferencias significativas con respecto al control. En el caso de las proteínas (Figura 18B) se observa un ligero efecto decreciente con la lactoferrina, aunque esta disminución no es tan apreciable.

Según Zhao *et al.* (2019) la lactoferrina bovina disminuye la permeabilidad paracelular y aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina y la resistencia eléctrica transepitelial, fortaleciendo la función de barrera, por lo que no aumenta el estrés oxidativo en las células del epitelio intestinal, manteniendo así su funcionalidad.

6.10. Expresión de receptores TLR 2 y TLR 4 mediante RT- PCR

El efecto de la infección de *C. sakazakii* a una concentración inicial de 4 u.log en las células Caco-2/TC7, tratadas con 0,5 y 10 mg/mL de lactoferrina bovina nativa, se analizó determinando la expresión de los receptores TLR2 y TLR4.

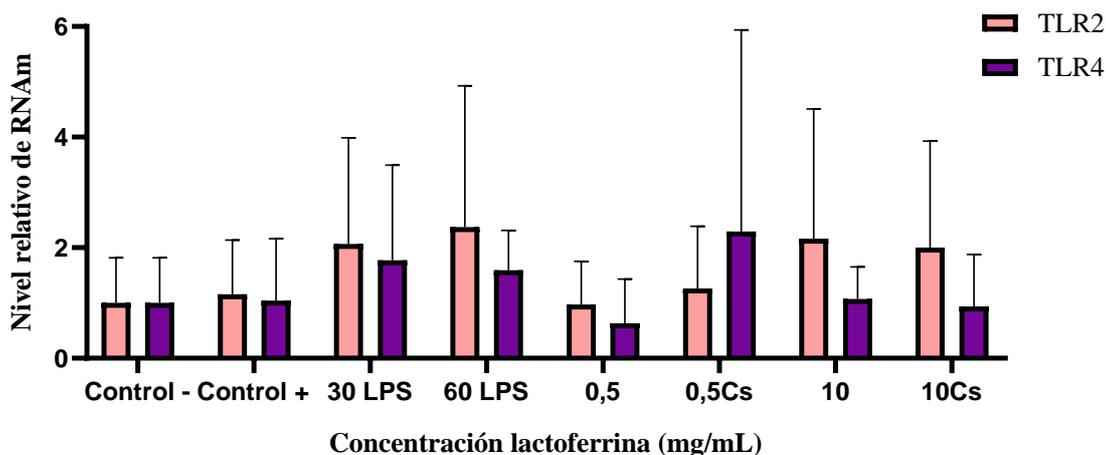


Figura 19. Expresión de receptores intestinales TLR 2 (•) y TLR 4 (•) en células Caco-2/TC7 tras la incubación con lactoferrina bovina nativa a las concentraciones de 0,5 y 10 mg/mL. Control-: control negativo de células sin proteína y sin patógeno; Control +: control positivo de células tratadas únicamente con el patógeno; 30 LPS: adición de 30 µg/mL de LPS; 60 LPS: adición de 60 µg/mL de LPS; 0,5: 0,5 mg/mL de lactoferrina, 0,5 Cs: 0,5 mg/mL de lactoferrina y *C. sakazakii*; 10: 10 mg/mL de lactoferrina; 10Cs: 10 mg/mL de lactoferrina y *C. sakazakii*. La expresión de receptores se expresa en nivel relativo de RNAm. Los valores representan la media ± desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes (n = 4).

Observando la Figura 19, cabe destacar que sólo la lactoferrina aumenta la expresión de receptores TLR 2 a la concentración de 10 mg/mL. Por otro lado, al infectar las células con *C. sakazakii* y añadir lactoferrina se aumenta la expresión de los receptores TLR 4, el cual parece reducido a la concentración de 10 mg /mL.

La elevada expresión de ambos receptores tras la adición de lipopolisacárido (LPS) a las concentraciones de 30 y 60 µg/mL se asocia con la respuesta defensiva de las células frente a agentes patógenos, puesto que es una endotoxina de la pared de algunas bacterias Gram negativas. El LPS o endotoxina es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desempeñan una importante función en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias. Está compuesto por una región lipídica y una glicosídica con funciones separadas y/o sinérgicas lo que hace de esta molécula uno de los factores de virulencia más complejos de comprender (Iregui *et al.*, 2010). Sin embargo, tras la incubación con *C. sakazakii* no se observa un incremento tan elevado de la expresión de los receptores, pudiendo ser debido a un tiempo insuficiente de exposición al patógeno.

Según Figueroa-Lozano *et al.* (2018), la lactoferrina bovina juega un papel importante en la activación de los receptores TLR 4. Así mismo, el trabajo de Yong *et al.* (2004), sugiere que LPS es necesario para la señalización de TLR 4 y forma parte de la función inmunomoduladora y la actividad antimicrobiana de lactoferrina.

No se observan diferencias significativas con respecto al control debido a la gran diferencia en las desviaciones estándar de las muestras, dadas las múltiples etapas del procedimiento experimental. Por ello, se deberían realizar un mayor número de ensayos, mejorando el complejo proceso de extracción del RNAm de las células.

7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Máster han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La mazada o buttermilk y el butterserum procedentes de la leche de vaca constituyen una materia prima de gran valor para la obtención de fracciones enriquecidas en lactadherina y mucina.
2. No se ha encontrado una reacción positiva al enfrentar la lactoferrina bovina con los sueros de niños alérgicos a la leche, por lo que se puede considerar segura la adición de lactoferrina bovina a leches infantiles.
3. La lactadherina tiene un gran potencial antibacteriano de interés frente a *Cronobacter sakazakii*, tal y como indican los resultados preliminares obtenidos en este trabajo, siendo necesaria la realización de futuras investigaciones para su confirmación.
4. La mucina tiene una alta actividad antimicrobiana frente al patógeno *C. sakazakii*, observándose reducciones significativas a concentraciones desde 0,11 a 1 mg/mL a las 4 y 24 h de incubación con la bacteria.
5. La lactoferrina bovina de Tatuá Nutritional y Armor VitalArmor presentan actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii* reduciendo el crecimiento del patógeno tanto a las 4 h como a las 24 h. Sin embargo, la lactoferrina de Armor VitalArmor muestra un mayor potencial antimicrobiano frente al patógeno, no detectándose crecimiento de *C. sakazakii* a las 24 h de incubación para la concentración de 10 mg/mL.
6. La lactoferrina bovina nativa procedente de Tatuá Nutritional tiene una mayor capacidad de inhibición de la adhesión de *C. sakazakii* a las células Caco-2 que la lactoferrina saturada con hierro. La lactoferrina bovina nativa produjo más inhibición a las concentraciones de 1, 2, 5 y 10 mg/mL, con una reducción del 70% en el caso

de 5 mg/mL.

7. La viabilidad de las células Caco-2/TC7 y el estrés oxidativo no se vieron afectados al incubarlas con lactoferrina bovina nativa, ni tras infectar las células con el patógeno *C. sakazakii*.
8. *C. sakazakii* no parece afectar a la expresión de receptores TLR2 y TLR4 a los tiempos de incubación estudiados, mientras que la lactoferrina bovina nativa a la concentración de 10 mg/mL aumenta la expresión de los TLR 2 y disminuye la de los TLR4 con y sin patógeno.

8. Bibliografía

- AECOSAN (2015).** Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de determinados alimentos por niños de 0 a 3 años. Revista del Comité Científico nº 22, pp. 19-78.
- Adlerova, L., Bartoskova, A. y Faldyna, M. (2008).** Lactoferrin: A review. *Veterinarni Medicina*, 53(9), pp. 457–468.
- Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T. y Petersen, T.E. (1997).** Bovine PAS 6/7 binds $\alpha V\beta 5$ integrin and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry*, 36, pp. 5441-5446.
- Andersen, M.H., Graversen, H., Fedosov, S.N., Petersen, T.E. y Rasmussen, J.T. (2000).** Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry*, 39, pp. 6200-6206.
- Bansil, R. y Turner, B.S. (2006).** Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, pp. 164-170.
- Butler, J.E. (1969).** Bovine Immunoglobulins: A Review. *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 52(12), pp. 1895–1909.
- Claeys, W., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K. y Herman, L. (2014).** Consumption of Raw or Heated Milk from Different Species: An Evaluation of the Nutritional and Potential Health Benefits. *Food Control*, 42, pp. 188–201.
- Codex Alimentarius (1999).** Norma del Codex para el uso de términos lecheros (CODEX STAN 206-1999).
- Comisión Europea (2012a).** Decisión de la Comisión, de 22 de noviembre de 2012, por la que se autoriza la comercialización de lactoferrina bovina como nuevo ingrediente alimentario en virtud del Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo (Morinaga). Diario oficial de la Unión Europea, L327, 46-48, 27.11.2012.

- Comisión Europea (2012b).** Decisión de la Comisión, de 22 de noviembre de 2012, por la que se autoriza la comercialización de lactoferrina bovina como nuevo ingrediente alimentario en virtud del Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo (Frisia Campina). Diario oficial de la Unión Europea, L327, 52-54, 27.11.2012.
- De Nardo, D. (2015).** Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine. Elsevier Ltd*, pp. 1–9.
- De Wit, J.N. (1990).** Thermal Stability and Functionality of Whey Proteins. *Journal of Dairy Science. Elsevier*, 73(12), pp. 3602–3612.
- Devaraj, N., Devaraj, H. y Bhavanandan, V.P. (1992).** Purification of mucin glycoproteins by density gradient centrifugation in cesium trifluoroacetate. *Analytical Biochemistry*, 206(1), pp. 142–146.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K. y Camp, J.V. (2008).** Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18, 436-457.
- Du, X., Wang, F., Lu, X., Rasco, B. y Wang, S. (2012).** Biochemical and genetic characteristics of *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Research in Microbiology. Elsevier Masson SAS*, 163(6–7), pp. 448–456.
- Embleton, N.D., Berrington, J.E., McGuire, W., Steward C.J. y Cummings, S.P. (2013).** Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. Elsevier Ltd*, 18(3), pp. 143–149.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2004).** Opinion adopted by the BIOHAZ Panel related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *EFSA Journal*, 113, pp. 1-35.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. (2008a).** *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series N° 15. Rome. pp. 84.
- Ferrandini, E., Castillo, M., López M. B. y Laencina, J. (2006).** Modelos estructurales de la micela de caseína. *Revistas Universidad de Murcia*, 22, pp. 5–18.
- Figueroa-Lozano, S., Valk-Weeber, R.L., Leeuwen, S.S., Dijkhuizen, L. y Vos, P. (2018).** Dietary N-Glycans from Bovine Lactoferrin and TLR Modulation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(2), pp. 1–30.
- Fox, P.F. (1989).** The milk protein system. In *Developments in Dairy Chemistry. Functional Milk Proteins*, 4.
- Gallier, S. y Singh, H. (2012).** Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion. *Food and Function*, 3, pp. 547–555.

- Gallier, S., Vockingb, K., Post, J.A., Van De Heijninga, B., Actona, D., Van Der Beeke, E.M. y Baalen, T.V. (2015).** A Novel Infant Milk Formula Concept: Mimicking the Human Milk Fat Globule Structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, pp. 329–339.
- Gantner, V. (2015).** The Overall and Fat Composition of Milk of Various Species. *Mljekarstvo*, 65, pp. 223–31.
- Gibbons, J.A., Kanwar, J.R. y Kanwar, R.K. (2015).** Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer. *BMC Cancer*, 15(1), pp. 1–16.
- González-Chávez, S.A., Arévalo-Gallegos, S. y Rascón-Cruz, Q. (2009).** Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, pp. 1-8.
- Guetouache, M., Guessas, B. y Medjekal, S. (2014).** Composition and Nutritional Value of Raw Milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2, pp. 115–122.
- Hazlett, R., Schmidmeier, C. y O'Mahony, J.A. (2019).** Milk Proteins. *Encyclopedia of Food Chemistry. Elsevier Inc.*, pp. 138-147.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J. y Borchardt, R.T. (1989).** Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology. Elsevier Inc.*, 96(2), pp. 736–749.
- Holden, K.G., Yim, N.C.F., Griggs, L.J. y Weisbach, J.A. (1971).** Gel electrophoresis of mucous glycoproteins. I. Effect of gel porosity. *Biochemistry*, 10, pp. 3105-3109.
- Horne, D.S. (2006).** Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11(2–3), pp. 148–153.
- Hvarregaard, J., Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T. y Petersen, T.E. (1996).** Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *European Journal of Biochemistry*, 240, pp. 628-636.
- Iversen, C. y Forsythe, S. (2003).** Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, 14(11), pp. 443–454.
- Jensen, R. G., Bitman, J., Carlson, S. E., Couch, S. C., Hamosh, M. y Newburg D. S. (1995).** Milk Lipids: A. Human Milk Lipids. *Handbook of Milk Composition*, 6, pp. 495–542.
- Ji, X., Li, X., Ma, Y. y Li, D. (2017).** Differences in proteomic profiles of milk fat globule membrane in yak and cow milk. *Food Chemistry. Elsevier Ltd*, 221, pp. 1822–1827.
- Joseph, S., Sonbol, H., Hariri, S., Desai, P., McClelland, M. y Forsythe, S.J. (2012).** Diversity of the *Cronobacter* Genus as Revealed by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, pp. 3031–3039.

- Kamińska, A., Enguita, F.J. y Stępień, E. (2018).** Lactadherin: An unappreciated haemostasis regulator and potential therapeutic agent. *Vascular Pharmacology*, 101, pp. 21–28.
- Kim, D.H., Kanno, C. y Mizokami, Y. (1992).** Purification and characterization of major glycoproteins, PAS-6 and PAS-7, from bovine milk fat globule membrane. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1122, pp. 203-211.
- Kodama, Y., Kimura, N. (2004).** Inhibitor of *Helicobacter pylori* colonization. Ghen Corporation. Número de patente: 6235709.
- Kumar, H., Kawai, T. y Akira, S. (2009).** Biochemical and Biophysical Research Communications Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications. Elsevier Inc.*, 388(4), pp. 621–625.
- Kutta, H., Willer, A., Steven, P., Bräuer, L., Tsokos, M. y Paulsen, F. (2008).** Distribution of Mucins and Antimicrobial Substances Lysozyme and Lactoferrin in the Laryngeal Subglottic Region. *Journal of Anatomy*, 213, pp. 473–481.
- Le, T.T., Van de Wiele, T., Do, T.N.H., Debyser, G., Struijs, K., Devreese, B., Dewettinck, K. y Van Camp, J. (2012).** Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, 95, pp. 2307-2318.
- Lin, L.C. y Beuchat, L.R. (2007).** Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. *Food Microbiology*, 24(7–8), pp. 767–777.
- Lomholt S.B. (1996).** The kinetics of the aggregation of casein micelles by rennet. Ph.D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Lönnerdal, B., y Iyer, S. (1995).** Lactoferrin, molecular structure and biological functions. *Annual Reviews of Nutrition*, 15, pp. 93–110.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N. y Robert, B. (2011).** Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry. Elsevier Ltd*, 125(2), pp. 355–368.
- Lou, X., Si, G., Yu, H., Qi, J., Liu, T. y Fang, Z. (2014).** Possible reservoir and routes of transmission of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* via wheat flour. *Food Control. Elsevier Ltd*, 43, pp. 258–262.
- MacGibbon, A.K.H. y Taylor, M.W. (2006).** Composition and structure of bovine milk lipids. En: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (Eds), *Advanced Dairy Chemistry*. 2(3), pp. 1-42.
- McGrath, B.A., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. y Kelly, A.L. (2016).** Composition and Properties of Bovine Colostrum: A Review. *Dairy Science and Technology*, 96, pp. 133–158.

- Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E. y Malcata, F.X. (2007).** Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, pp. 1197-1211.
- Parrón, J.A., Ripollés, D., Sánchez, A.C., Pérez, M.D., Calvo, M., López, S., Arias, C.F. y Sánchez, L. (2018).** Antiviral activity of bovine milk components: Extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism. *Journal of Functional Foods*, 44, pp. 103-111.
- Pérez, M.D., Aranda, P., Sánchez, L., Ena, J.M., Oria, R. y Calvo, M. (1990).** Synthesis and evolution of concentration of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cow and sheep colostrum and milk through early lactation. *Cellular and Molecular Biology*, 36, pp. 205-212.
- Permyakov, E. A. y Berliner, L. J. (2000).** α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, 473, pp. 269–274.
- Quintero-Villegas, M.I., Wittke, A. y Hutkins, R. (2014).** Adherence Inhibition of *Cronobacter sakazakii* to Intestinal Epithelial Cells by Lactoferrin. *Current Microbiology*, 69(4), pp. 574–579.
- Rasmussen, J.T. (2009).** Bioactivity of milk fat globule membrane proteins, *Aust. J. Dairy Technol.* 64, pp. 63-67.
- Raymond, A., Ensslin, M.A., y Shur, B.D. (2009).** SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106, pp. 957-966.
- Reglamento (CE) N° 853/2004** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (DO núm. 139, de 30 de abril de 2004).
- Riccio, P. (2004).** The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends in Food Science and Technology*, 15(9), pp. 458–461.
- Ripollés, D., Parrón, J. A., Fraguas, J., Calvo, M., Pérez, M.D. y Sánchez, L. (2018).** Determination of lactadherin concentration in dairy by-products by ELISA: Effect of heat treatment and hydrolysis. *Journal of Dairy Science. American Dairy Science Association*, 101(2), pp. 912–923.
- Romero H.S. y Iregui C.A. (2010).** El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, 19, pp. 37-45.
- Sando, L., Pearson, R., Gray, C., Parker, P., Hawken, R., Thomson, P.C., Meadows, J.R.S., Kongsuwan, K., Smith, S. y Tellam, R.L. (2009).** Bovine Muc1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. *Journal of Dairy Science*, 92, pp. 5276-5291.

- Shoormasti, R.S., Pourpak, Z., Yazdanyar, Z., Lebaschi, Z., Teymourpour, P., Barzegar, S. y Tazesh, B. (2011).** The most common cow's milk allergenic proteins regarding to allergic symptoms. *Clinical and Translational Allergy*, 1(S1), pp. 62.
- Singh, N., Goel, G. y Raghav, M. (2015).** Insights into virulence factors determining the pathogenicity of *Cronobacter sakazakii*. *Virulence*, 6(5), pp. 433–440.
- Sociedad Española de Inmunología Clínica, Alergología y Asma Pediátrica, Barcelona (n.d.)** Análisis de sangre, S.E.I.C.A.P. Disponible en: http://pacientes.seicap.es/es/an%C3%A1lisis-de-sangre_40181
- Sperandio, B., Fischer, N. y Sansonetti, P. J. (2015).** Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. *Seminars in Immunology. Elsevier Ltd*, 27(2), pp. 111–118.
- Valenti, P. y Antonini, G. (2005).** Lactoferrin: An important host defence against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), pp. 2576–2587.
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne C. y Blecker, C (2010).** Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *BASE*, 14(3), pp. 485-500.
- Yan, X. y Gurtler, J.B. (2014).** *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. Elsevier Ltd*. 1, pp. 528-532.
- Yong, J.N., Sang, B.H., Jong, S.K., Yeo, D.Y., Song-Kyu, P., Hwan, M.K., Kyu, Y. y Cheol, O.J. (2004).** Lactoferrin works as a new LPS-binding protein in inflammatory activation of macrophages. *International Immunopharmacology*, 4(9), pp. 1187–1199.
- Zhao, X., Xu, X., Liu, Y., Xi, E., An, J., Tabys, D. y Liu, N. (2019).** The in vitro protective role of bovine lactoferrin on intestinal epithelial barrier. *Molecules*, 24(1), 148.