

Actividades antibacterianas de lactoferrina

M. en C. María Elisa Drago Serrano
Antibacterial activities of lactoferrin

Fecha de aceptación: enero 2006

Resumen

Diversas especies de mamíferos producen lactoferrina, una glicoproteína no hémica de unión a hierro perteneciente a la familia de las transferrinas. La lactoferrina está presente en una variedad de fluidos exocrinos y es particularmente abundante en leche y calostro. La lactoferrina es un componente esencial de los mecanismos innatos de defensa del hospedero, puesto que exhibe diversas actividades antibacterianas y además por su estratégica presencia en las secreciones diseminadas sobre las superficies mucosas que continuamente están expuestas al contacto con bacterias patógenas. La investigación básica de las propiedades antibacterianas de la lactoferrina ha influido en estudios clínicos relacionados con estrategias profilácticas para la prevención de enfermedades bacterianas, así como en el diseño de métodos terapéuticos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos.

Palabras clave: *lactoferrina, defensa innata, agentes antibacterianos, proteínas de unión a hierro*

Abstract

Several species of mammals produce lactoferrin, a nonheme iron-binding glycoprotein belonging to the transferrin family. Lactoferrin is distributed in a variety of exocrine fluids and it is particularly abundant in milk and colostrum. Lactoferrin is an essential component of innate mechanisms of host defense on account of displaying several antibacterial activities and by its strategic presence in secretions spread over mucosal surfaces which are frequently exposed to the contact to pathogenic bacteria. Basic research about the antibacterial activities of lactoferrin has influenced on clinical studies related to prophylactic strategies to prevent infectious diseases as well as on the design of therapeutic methods for the treatment of diseases caused by antibiotic resistant bacteria.

Keywords: *lactoferrin, innate defense, antibacterial agents, iron binding proteins.*

Introducción

Desde su descubrimiento y caracterización, la lactoferrina (Lf) ha sido sujeta a numerosos estudios sobre su estructura, biosíntesis, distribución tisular, metabolismo y propiedades biológicas.^{1,2,3} La Lf es una proteína no hémica de unión a hierro perteneciente a la familia de las transferrinas, producida por diversas especies de mamíferos. A diferencia de otros miembros de la familia de las transferrinas como la transferrina sérica, cuyo papel biológico más relevante es el transporte de hierro, la función primaria atribuida a la Lf es colaborar en mecanismos innatos de protección del hospedero.⁴ El papel de la Lf como componente

esencial de la respuesta innata de defensa se ve reflejado por su amplia distribución en secreciones diseminadas en las superficies mucosas que recubren glándulas exocrinas y diversos conductos como el tracto respiratorio, intestinal y genitourinario. Dichas secreciones forman parte de la primera línea de defensa del hospedero que enfrenta el contacto directo con agentes patógenos que colonizan o invaden las superficies mucosas.⁴ Numerosas evidencias experimentales generadas en su mayor parte en ensayos *in vitro* demuestran que la Lf es una molécula multifuncional capaz de exhibir actividad antimicrobiana sobre

Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, CP 04960, Deleg. Coyoacán, México DF, México. Teléfono: 5483-7250 Fax: 5483-7237 e-mail: mdrago@correo.xoc.uam.mx

un amplio espectro de agentes patógenos entre los que se incluyen: bacterias, levaduras, hongos, protozoarios y virus.⁵ Estudios *in vivo*, muestran que la Lf puede actuar como modulador de la inflamación y de la respuesta inmunitaria.⁶ Mediante esta actividad inmunomoduladora, la Lf refuerza la efectividad de su acción antimicrobiana.

Considerando que la Lf es un efector humoral no específico que cumple un papel estratégico en los mecanismos innatos de protección del hospedero, el propósito de este trabajo fue exponer los efectos antibacterianos de la Lf reconocidos a la fecha con especial énfasis sobre bacterias patógenas.

Características estructurales y distribución de lactoferrina

Estructural y funcionalmente, la Lf humana y bovina han sido las más ampliamente estudiadas y, por ende, las mejores caracterizadas. La Lf pertenece a la familia de proteínas no hémicas conocidas como transferrinas, entre las que figura también la transferrina sérica (Tfs).¹ La Lf es una glicoproteína monomérica de 80 kDa de peso molecular con puentes disulfuro intramoleculares, doblada en dos regiones conocidas como lóbulos terminal N y C que, a su vez, están organizados en dos dominios: N1 y N2, C1 y C2.² En cada lóbulo N2 y C2 reside un lugar donde el ion férrico (Fe^{3+}) se une sinérgicamente con el ion carbonato (CO_3^{2-}). Por su capacidad de unir Fe^{3+} reversiblemente, la Lf puede existir como holo Lf (asociada a Fe^{3+}) o apo Lf (libre de Fe^{3+}).³ La Lf es una molécula fuertemente catiónica con un punto isoeléctrico entre 8.5-9. A diferencia de la Tfs que empieza a liberar iones Fe^{3+} a pH 6, la Lf es capaz de retenerlos a valores de pH tan bajos como 3.5-4.0.¹

La Lf es una proteína producida por ciertas especies de mamíferos. En humanos, la regulación de la síntesis de Lf es específica para cada tejido y está sometida a control hormonal.² La Lf es secretada como apo Lf por células epiteliales de glándulas mamarias, lagrimales, salivales, páncreas y bilis.

Dependiendo de su sitio de secreción, la Lf en el humano está distribuida en secreciones bronquiales, fluido vaginal, semen,³ jugo pancreático y gástrico, bilis, lágrimas y saliva.² En humanos y bovinos, la Lf es particularmente abundante en calostro y leche.^{4,6} La Lf también es sintetizada y almacenada en los gránulos

secundarios de neutrófilos maduros durante su transición de promielocito a mielocito.⁴ La Lf plasmática deriva predominantemente de neutrófilos y su concentración puede ser baja en condiciones normales o elevada durante procesos inflamatorios.³ Al ocurrir la inflamación, los neutrófilos se activan, subsecuentemente se degranulan y liberan Lf en el plasma.

Propiedades antimicrobianas de Lf

Actividad bacteriostática e inhibición de biofilms

El efecto bacteriostático de la Lf en su forma de apo Lf se ha atribuido a su habilidad de captar el ion Fe^{3+} y limitar así su utilización por bacterias patógenas,⁵ que lo requieren como factor esencial para su crecimiento y expresión de factores de virulencia.⁷ Se ha demostrado que, dependiendo de la dosis ensayada, la apo Lf inhibe el crecimiento de bacterias patógenas no invasoras como *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigénica (ETEC),⁸ y *Helicobacter pylori*.⁹ Adicionalmente, la apo Lf ha sido efectiva para inhibir *in vitro* la multiplicación intracelular de *Legionella pneumophila* en cultivos celulares¹⁰ y de bloquear el crecimiento intracelular *in vivo* de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos de ratones infectados con dicha bacteria.¹¹ Estudios basados en modelos animales de experimentación han demostrado que el efecto bacteriostático *in vivo* de la Lf no depende de sus propiedades quelantes del Fe^{3+} , sino de su capacidad para estimular la absorción intestinal de carbohidratos y abatir su disponibilidad para el crecimiento bacteriano.¹² Algunas bacterias patógenas no sólo son capaces de contrarrestar las propiedades quelantes de la Lf sino además la aprovechan como fuente de hierro. Este último puede ser removido directamente de la Lf por receptores expresados en la superficie de ciertas bacterias patógenas Gram positivas y negativas. Otras bacterias patógenas captan el hierro en forma indirecta mediante la secreción de sideróforos capaces de remover el Fe^{3+} de la Lf, el complejo Fe-sideróforo formado es capturado en la superficie bacteriana por receptores.⁷

La Lf impide la agregación bacteriana y la eventual formación de biofilms causantes de daño tisular observado en ciertas enfermedades crónicas. Ensayos *in vitro* muestran que a concentraciones bacteriostáticas subóptimas, la Lf inhibe biofilms del patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* implicado en el daño al tejido pulmonar en pacientes con fibrosis quística.¹³ La Lf inhibe también *in vitro* biofilms del patógeno oral *Streptococcus mutans* causante de la caries dental.¹⁴

Actividad bactericida y estimulación del efecto de antibióticos

La Lf ejerce un efecto bactericida directo por su capacidad de unirse a porinas¹⁵ y al lípido A¹⁶ del LPS, presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas. La Lf es una glicoproteína fuertemente catiónica cuya carga positiva interacciona mediante atracciones electrostáticas con grupos aniónicos cargados negativamente de componentes de la membrana externa. Dicha interacción induce la liberación de moléculas expresadas en la membrana externa ocasionando su desestabilización y subsecuentemente la pérdida de su permeabilidad. La capacidad de la Lf de propiciar la remoción del LPS de la membrana externa puede ser modulada *in vitro* por iones calcio y magnesio.¹⁷ La interacción de Lf sobre la membrana externa de bacterias Gram negativas estimula el efecto de antibióticos al facilitar su ulterior acceso al interior de la bacteria. La unión a porinas de la Lf potencia la susceptibilidad de cepas de *Salmonella* hacia la eritromicina.¹⁸ El efecto de algunos agentes antibacterianos que son excluidos de la membrana externa es potenciado por la Lf ya que facilita su contacto con la bacteria.¹⁹ Análogamente a lo observado sobre Gram negativas, la unión de la Lf sobre componentes de la pared celular de bacterias Gram positivas es un prerrequisito para ejercer su actividad bactericida. La carga positiva de la Lf favorece su interacción con estructuras aniónicas de la pared celular como es el ácido lipoteicoico (LT) y con ello potencia el efecto de agentes antimicrobianos naturales como la lisozima. La unión de la Lf con LT disminuye la carga negativa de la superficie de la pared celular, lo cual favorece el contacto de la lisozima con el péptidoglucano subyacente sobre el cual ejerce su efecto enzimático.²⁰

Inhibición de adherencia e invasión bacteriana

Evidencias experimentales muestran que la Lf bloquea *in vitro* e *in vivo* la adherencia celular de bacterias causantes de diarrea como *E coli* enteropatógena (EPEC),²¹ ETEC,²² *E coli* enteroagregativa (EAEC) y *E coli* de adherencia difusa (DAEC)²³ así como de varias especies de *Shigella*.²⁴ Aunque se desconoce con claridad el mecanismo de inhibición de adherencia, se ha sugerido que los glicanos de la Lf de tipo oligomanósidos se unen a adhesinas bacterianas impi-

diendo su interacción con los receptores de la célula hospedera. Se ha confirmado que los glicanos de la Lf actúan como receptores de adhesinas expresadas en fimbrias tipo I de algunas enterobacterias; dicha unión ligando-receptor implica la inhibición de la actividad hemaglutinante mediada por estas adhesinas.²⁵ Otro posible mecanismo de inhibición de adherencia podría estar vinculado a la capacidad proteolítica de Lf que le permite extraer y liberar factores de colonización expresados en la membrana externa, como en el caso del precursor de la proteína autotransportadora IgA proteasa producida por *Haemophilus influenzae*, agente causal de otitis infantil aguda.²⁶ Además de bloquear la adherencia bacteriana, la Lf es capaz de inhibir la invasión intracelular *in vitro* de diversas especies de *Shigella*²⁴ y de la clona recombinante de *E coli* HB101 (pRI203) que expresa moléculas que favorecen la invasión intracelular de *Yersinia pseudotuberculosis* conocidas como invasinas.²⁷ Un mecanismo que inhibe la invasión sugiere que la Lf favorece la liberación de enzimas proteolíticas presentes en la superficie bacteriana que degradan antígenos IpaBC responsables de la fagocitosis dirigida por la bacteria invasora *Shigella*.²⁸ En modelos experimentales también se ha corroborado que la Lf inhibe *in vivo* la capacidad invasiva de *Listeria monocytogenes*.²⁹

Actividad de serin proteasa e inhibidor de proteasas

La Lf exhibe actividad enzimática de serin proteasa sobre diversos sustratos como la adhesina Hap, proteína autotransportadora que facilita la colonización tisular de *Haemophilus influenzae*.²⁶ También se ha observado que la Lf ejerce actividad de serin proteasa sobre factores de virulencia secretados por el sistema de secreción tipo III de bacterias Gram negativas como son las proteínas secretadas EspA, EspD y particularmente EspB.³⁰ Tales proteínas se encuentran implicadas en la adherencia íntima que está estrechamente asociada con la generación de diarrea causada por EPEC. Otras proteínas de secreción tipo III degradadas por la Lf son las invasinas IpaB e IpaC que forman un complejo que favorece la fagocitosis dirigida por *Shigella*.³⁰ Al parecer, el sitio activo asociado a serin proteasa de la Lf se localiza primordialmente en el dominio N de la Lf.³¹ Además de actuar como proteasa, la Lf presente en la leche funciona como inhibidor de cistein proteasas como son: la papaína, tripsina y catepsina.³² La actividad como inhibidor de cistein proteasas de la Lf reside en una secuencia de

aminoácidos del extremo carboxilo, que muestra una fuerte homología con la secuencia de un dominio común activo de la súper familia de cistatinas, por lo cual la Lf puede considerarse como miembro de esta familia.³² Se ha sugerido que la Lf podría desempeñar un papel relevante en la protección contra infecciones bacterianas y como agente antiséptico debido a su capacidad de inhibir de cistein proteasas de bacterias patógenas.³²

Péptidos bactericidas derivados de lactoferrina

Diversas evidencias experimentales muestran que la actividad bactericida de la Lf reside en su lóbulo amino terminal del cual surgen péptidos antibacterianos como la Lactoferricina (Lfcn). La Lfcn es un péptido catiónico que deriva de la hidrólisis del dominio N de la Lf con la enzima pepsina.³³ En diversos estudios se ha confirmado que la actividad bactericida de la Lfcn es mayor que la de la Lf³³ y dicha actividad no involucra el sitio de unión a hierro.³⁴ La Lfcn de origen bovino es la que exhibe mayor potencia bactericida comparada con la Lfcn humana, murina y caprina.³⁵ Al evaluar la actividad de la Lfcn bovina natural^{36,37} y de péptidos sintéticos homólogos a Lfcn³⁸ se observó que su efecto bactericida residió en su capacidad de dañar la membrana externa ocasionando la lisis de bacterias patógenas Gram negativas como *Salmonella*,³⁶ *E coli* enterohemorrágica O157:H7³⁷ y *E coli* O111.³⁸ El efecto bactericida de péptidos derivados de la Lf ha sido corroborado en bacterias resistentes a los antibióticos.³⁹ La actividad bactericida de la Lfcn se asoció a un efecto protector *in vivo* contra la infección urinaria producida por *E coli* uropatógena (UPEC) en ratones tratados previamente con Lfcn e infectados después con dicha bacteria.⁴⁰ Otras propiedades antimicrobianas atribuidas a la Lfcn incluyen su capacidad de bloquear la adherencia bacteriana,⁴¹ de inhibir la invasión celular de bacterias patógenas intra-

celulares como *Yersinia pseudotuberculosis*⁴¹ y *Listeria monocytogenes*⁴² así como inhibir la síntesis de ADN y ARN en bacterias Gram positivas y Gram negativas.³³

Conclusiones y perspectivas

Gracias a la amplia investigación realizada mayormente en ensayos *in vitro* sobre las propiedades antibacterianas de la Lf, ha sido posible comprender su contribución en los mecanismos innatos de protección del hospedero contra bacterias patógenas que colonizan o invaden mucosas. Un aspecto clínico relevante del estudio de la Lf y de sus péptidos antimicrobianos es su potencial aplicación profiláctica como reforzadores de procesos implicados en la prevención de infecciones intestinales pediátricas. Desde hace tiempo se están elaborando alimentos de fórmula complementados con Lf obtenida de suero de leche bovina⁴³ o con Lf recombinante humana.⁴⁴ Algunos alimentos para lactantes están complementando con hidrolizados enzimáticos con pepsina de Lf con un alto contenido de péptidos bactericidas.⁴³ La efectividad profiláctica de estos alimentos, así como su bioseguridad, está siendo valorada en ensayos *in vitro*, modelos animales de experimentación y estudios clínicos antes de ser distribuidos comercialmente.

Otra perspectiva es la aplicación terapéutica de Lf como antibiótico natural o potenciador del efecto de agentes antimicrobianos naturales como lisozima o bien de antibióticos que sean efectivos contra bacterias que han desarrollado resistencia a diversos antibióticos.

Aun cuando no se conocen con detalle muchos aspectos mediante los cuales la Lf ejerce su poder antibacteriano, su estudio tiene un futuro promisorio por su relevancia en los mecanismos innatos de protección contra bacterias patógenas y repercusión en diversas aplicaciones clínicas como agente profiláctico y terapéutico.

Bibliografía

1. Baker EN, Baker HM. Molecular Structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2531-2539
2. Vorland LH. Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein. *APMIS* 1999; 107: 971-981
3. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: A general review. *Haematological* 1995; 80: 252-267
4. Mayer L, Waker WA. "Development and physiology of mucosal defense: an Introduction". In *Mucosal Immunology*. Elsevier Academic Press, San Diego Calif. USA. Messtecky J, Lamm ME, McGhee JR, Bienenstock J, Mayer L, Strober W (Eds.). Part I, 3^o Edition, 2005, cap.1: 5-18
5. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 2004; 17: 189-196
6. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2549-2559
7. Reyes-Reyes RE, Manjarrez-Hernández HA, Drago-Serrano ME. El hierro y la virulencia bacteriana. *Enf Inf Microbiol* 2005; 25: 104-107
8. Dionysius DA, Grieve PA, Milne JM. *Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic Escherichia coli*. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2597-2600
9. Dial EJ, Hall LR, Serna H, Romero JJ, Fox JG, Lichtenberger LM. *Antibiotic properties of bovine lactoferrin on Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 1998; 43:2750-2756
10. Goldoni P, Sinibaldi L, Valenti P, Orsi N. *Metal complexes of lactoferrin and their effect on the intracellular multiplication of Legionella pneumophila*. *Biometals* 2000;13:15-22
11. Schaible UE, Collins HL, Priem F, Kaufmann SH. *Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their susceptibility to tuberculosis*. *J Exp Med* 2002; 196: 1507-1513
12. Ogata T, Teraguchi S, Shin K, Kingaku M, Fukuwatari Y, Kawase K, Hayasawa H, Tomita M. *The mechanism of in vivo bacteriostasis of bovine lactoferrin*. *Adv Exp Med Biol* 1998; 443: 239-246
13. Rogan MP, Taggart CC, Green CM, Murphy PC, O'Neill SJ, McElvaney NG. *Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to a decreased lactoferrin activity in patients with fibrosis cystic*. *J Infect Dis* 2004; 190: 1245-1253
14. Berlutti F, Ajello M, Bosso P, Morea C, Petrucca A, Antonini G, Valenti P. *Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in Streptococcus mutans*. *Biometals* 2004; 17: 271-278
15. Sallmann FR, Baveye-Descamps S, Pattus F, Salmon V, Branza N, Spik G, Legrand D. *Porins OmpC and PhoE of Escherichia coli as specific cell surface targets of human lactoferrin. Binding characteristics and biological properties*. *J Biol Chem* 1999; 274: 16107-16114
16. Appelmek BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J, Nuijens JH. *Lactoferrin is a Lipid A-binding protein*. *Infect Immun* 1994; 62: 2628-2632
17. Ellison RT, Laforce FM, Giehl TJ, Boose DS, Dunn BE. *Lactoferrin and transferrin damage of the Gram negative outer membrane is modulated by Ca²⁺ and Mg²⁺*. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 1437-1446
18. Naidu AS, Arnold RR. *Lactoferrin interaction with salmonellae potentiates antibiotic susceptibility*. *Diag Microbiol Infect Dis* 1994; 20: 69-75
19. Ellison RT 3rd, Giehl TJ, La Force FM. *Damage of the outer membrane of enteric gram negative bacteria by lactoferrin and transferrin*. *Infect Immun* 1988; 56: 2774-2781
20. Leitch EC, Willcox MD. *Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme*. *J Med Microbiol* 1999; 48: 867-871
21. Ochoa TJ, Noguera Obenza M, Ebel F, Guzmán CA, Gómez HF, Cleary TG. *Lactoferrin impairs type III secretory system function in Enteropathogenic Escherichia coli*. *Infect Immun* 2003; 71: 5149-5155
22. Kawasaki Y, Tazume S, Shimizu K, Matsuzawa H, Dosako S, Isoda H, Tsukiji M, Fujimura R, Muranaka Y, Ishida H. *Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic Escherichia coli to host cells*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 348-354
23. Nascimento de Araujo A, Giugliano LG. *Human milk fractions inhibit the adherence of diffusely adherent Escherichia coli (DAEC) and enteroaggregative E. coli (EAEC) to HeLa cells*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184: 91-94
24. Willer EM, Lima R de L, Giugliano LG. *In vitro adhesion and invasion inhibition of Shigella dysenteriae, Shigella flexneri and Shigella sonnei clinical strains by human milk proteins*. *BMC Microbiol* 2004; 4: 18-24
25. Teraguchi S, Shin K, Fukuwatari Y, Shimamura. *Glycans of bovine lactoferrin function as receptors for the type I fimbrial lectin of Escherichia coli*. *Infect Immun* 1996; 64: 1075-1077

26. Qiu J, Hendrixson DR, Baker EN, Murphy TF, St Geme JW 3rd, Plaut AG. *Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by Haemophilus influenzae*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 12641-12646
27. Longhi C, Conte MP, Seganti L, Polidoro M, Alfsen A, Valenti P. *Influence of HeLa lactoferrin on the entry process of Escherichia coli HB101 (pRI203) in cells*. Med Microbiol Immunol 1993; 182:25-35
28. Gómez HF, Ochoa TJ, Carlin LG, Cleary TG. *Human lactoferrin impairs virulence of Shigella flexneri*. J Infect Dis 2003; 187: 87-95
29. Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee BH, Kang PD, Kim YS, Park JH. *Potential antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with Listeria monocytogenes in mice*. J Med Microbiol 2005; 54: 1049-1054
30. Ochoa TJ, Cleary TG. *Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems*. Biometals 2004; 17: 257-260
31. Hendrixson DR, Qiu J, Shewry SC, Fink DL, Petty S, Baker EN, Plaut AG, St Geme III JW. *Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites*. Mol Microbiol 2003; 47: 607-617
32. Ohashi A, Murata E, Yamamoto K, Majima E, Sano E, Le QT, Katunuma N. *New functions of lactoferrin and β -casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors*. Biochem Biophys Res Commun 2003; 306: 98-103
33. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. *Lactoferricin: a lactoferrin derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties*. Cell Mol Life Sci 2005; 62: 2588-2598
34. Dionysius DA, Milne JM. *Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization*. J Dairy Sci 1997; 80: 667-674
35. Vorland LH, Ulvatne H, Andersen J, Haukland H, Rekdal O, Svendsen JS, Gutteberg TJ. *Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin*. Scand J Infect Dis 1998; 30: 513-517
36. Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison III RT. *Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment*. Infect Immun 1993; 61: 719-728
37. Shin K, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H, Tomita M, Otsuka Y, Yamazaki S. *Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Lett Appl Microbiol 1998; 26: 407-411
38. Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW. *Structure function relationship of bacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against Escherichia coli serotype O111*. Infect Immun 1998; 66: 2434-2440
39. Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM, van Berkel LA, van Berkel PH, Pauwels EK, Nuijens JH. *Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic resistant bacteria*. Infect Immun 2001; 69: 1469-1476
40. Håversen LA, Engberg I, Baltzer L, Dolphin G, Hanson LÅ, Mattsby-Baltzer I. *Human lactoferrin and peptides derived from surface exposed helical region reduce experimental Escherichia coli urinary tract infection in mice*. Infect Immun 2000; 68: 5816-5823
41. Di Biase AM, Tinari A, Pietrantonio A, Antonini G, Valenti P, Conte MP, Superti F. *Effect of bovine lactoferricin on enteropathogenic Yersinia adhesion and invasion in HEp-2 cells*. J Med Microbiol 2004; 53: 407-412
42. Longhi C, Conte MP, Penta M, Cossu A, Antonini G, Superti F, Seganti L. *Lactoferricin influences early events of Listeria monocytogenes infection in THP-1 human macrophages*. J Med Microbiol 2004; 53: 87-91
43. Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H. *Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications*. Biochem Cell Biol 2002; 80: 109-112
44. Lonnerdal B. *Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk*. Adv Exp Med Biol 2004; 554: 11-25