

## Biodistribución de IgA secretora purificada de calostro humano en fluidos biológicos de ratón Balb/c

Nadine Álvarez,<sup>1\*</sup> Frank Camacho<sup>1</sup>, Oscar Otero,<sup>1</sup> Reinaldo Acevedo,<sup>1</sup> Yolanda Valdés,<sup>1</sup> Daiyana Díaz,<sup>1</sup> Mildrey Fariñas,<sup>1</sup> Luis Izquierdo,<sup>1</sup> María E. Sarmiento,<sup>1</sup> Norazmi Mohd,<sup>3</sup> Armando Acosta<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación y Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa. La Habana, Cuba. AP. 16017, CP11600.

<sup>2</sup> Escuela de Ciencias Médicas, Universidad Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Malasia.

**email:** nalvarez@finlay.edu.cu

La IgA secretora humana (IgAsh) es estructural y funcionalmente liberada por el ambiente mucosal, con la capacidad de neutralizar antígenos, participa en la aglutinación y exclusión de estos y previene la adherencia de patógenos a las superficies del epitelio mucosal. En este estudio se evaluó la biodistribución de la IgAsh purificada de calostro, después de su administración por vía intranasal, en el modelo de ratón Balb/c y se determinaron los niveles de esta inmunoglobulina en diferentes fluidos biológicos mediante ELISA. Los resultados mostraron la presencia del anticuerpo en saliva de los animales del grupo que recibió la IgAsh en todos los intervalos de tiempo estudiados. En las muestras de lavado tráqueo-bronquial se obtuvo solo la presencia del anticuerpo a las 2 y 3 h posteriores a la inoculación. A partir de los resultados obtenidos consideramos interesante en el futuro utilizar este modelo experimental para evaluar el papel protector de esta inmunoglobulina como candidato terapéutico frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

**Palabras clave:** Inmunoglobulina A, anticuerpos, inmunidad mucosal.

### Introducción

Diversos estudios se refieren a la biología de la inmunoglobulina A (IgA) y su papel en la inmunidad frente a los patógenos mucosales. La IgA es el isotipo de anticuerpo con mayores niveles en las superficies mucosales y representa la segunda en concentración entre las inmunoglobulinas circulantes (1,2).

La IgA secretora (IgAs) es liberada en los fluidos mucosales mediante el proceso de transcitos, el cual involucra la unión al receptor polimérico de inmunoglobulina (IgRp) en la cara baso-lateral de las células epiteliales, seguido de liberación y translocación al lado apical en forma de complejo con el componente secretor (3).

Existen algunos estudios donde se ha evaluado el papel de la IgA, en forma de AcM, frente a la infección por *M. tuberculosis*. El más reciente de ellos, realizado por Balu y cols, mostró que la inoculación intranasal de un AcM de IgA (2E91IgA1) e IFN- $\gamma$  recombinante de ratón, inhibe significativamente la infección pulmonar por *M. tuberculosis* H37Rv en ratones transgénicos para CD89, no siendo así en los ratones del grupo control negativo. Por lo que sugieren que la unión al receptor CD89 es necesaria para la protección pasiva conferida por la IgA (4).

Adicionalmente, el tratamiento con IFN- $\gamma$  3 días antes de la infección y con AcM de IgA de acr, 2 h antes, así como 2 y

7 días después de la infección por aerosol con *M. tuberculosis* H37Rv, disminuye la infección en el pulmón a las cuatro semanas, efecto mayor que cuando se administró la IgA o el IFN- $\gamma$ , por sí solos (5).

Por otro lado, la aplicación intranasal de AcM IgA contra acr1, mostró efecto protector contra la infección pulmonar temprana por *M. tuberculosis* en ratón (6). Otro estudio evaluó el efecto de la administración de un AcM de IgA contra la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis* (TBA61) en ratones, frente a la infección por *M. tuberculosis*, donde se observó una reducción de la carga bacteriana y cambios morfométricos e histopatológicos importantes en los pulmones de los ratones tratados con ese AcM (7). Se conoce, además, que ratones deficientes en IgA son más susceptibles a la infección intranasal con *M. bovis* BCG, indicando el papel de la IgA en la protección contra la infección por micobacterias en el tracto respiratorio (8).

Estudios previos evalúan la transmisión de la IgA de ratón inoculada por diferentes vías y hacia diferentes fluidos corporales en ratón Balb/c (9-12), pero hasta la actualidad no se han reportado antecedentes de estudios de biodistribución de IgA secretora humana.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en el presente trabajo se evaluó la distribución de la IgA secretora purificada de calostro humano en diferentes fluidos biológicos, luego de su administración intranasal a ratón Balb/c, para conocer

\* Máster en Ciencias. Departamento de Biología Molecular, Instituto Finlay.

la potencialidad de este modelo experimental en futuros estudios sobre el papel de la IgAsh en la protección frente a la infección por *M. tuberculosis*.

## Materiales y Métodos

### Obtención de IgAsh

La IgAsh se obtuvo de una mezcla de calostro humano donado por madres sanas entre los primeros 3 a 5 días posteriores al parto. La purificación se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico y posteriormente filtración en gel, empleando DEAE Sepharose FF y Superose 6, grado preparativo, respectivamente. La presencia de la IgA en las fracciones cromatográficas fue identificada mediante Dot blot y la fracción de IgA fue analizada mediante electroforesis en SDS-PAGE al 12,5%, bajo condiciones reductoras. Con esta evaluación se determinó la ausencia de contaminantes mediante la visualización de solo las cadenas pesada y ligera de la IgAs, así como de su componente secretor, con un patrón de migración correspondiente a sus respectivos pesos moleculares (13).

### Animales

Para este estudio se emplearon ratones hembras de la línea isogénica Balb/c, procedentes del Centro de Producción para Animales de Laboratorio (CENPALAB), entre 8 y 10 semanas de edad. Durante el experimento los animales fueron mantenidos en condiciones adecuadas, según las normas establecidas por el Comité de Ética del Instituto Finlay, y la extracción de las muestras se realizaron en un gabinete de seguridad biológica de nivel II.

### Cinética de distribución de la Ig Ash en fluidos de ratón Balb/c

Los animales fueron distribuidos en dos grupos, cada uno con 20 ratones. Se empleó el esquema siguiente: Grupo no tratado: inoculado con 50  $\mu$ L de solución tampón fosfato por vía intranasal (25  $\mu$ L en cada fosa nasal) y Grupo IgAsh: inoculado con 1 mg de IgAsh en 50  $\mu$ L de solución tampón fosfato, por vía intranasal (25  $\mu$ L en cada fosa nasal), empleando para su administración en ambos casos una micropipeta.

Para determinar la presencia de la IgAsh se extrajeron muestras de saliva y lavado tráqueo-bronquial. Para ello se tomaron cinco animales diferentes de cada grupo con intervalos de 1, 2, 3 y 5 h después de la inoculación. Las muestras de saliva se obtuvieron entre 1 y 3 min después de la inoculación de 50  $\mu$ L de una solución de pilocarpina al 1% (IMEFA, La Habana, Cuba), por vía intraperitoneal.

El lavado fue recolectado mediante exposición de la tráquea y se recuperó a partir de la inoculación de 1 mL de solución salina (0,9%) por vía intratraqueal, usando jeringuilla de 1 mL.

Las muestras de lavado se colectaron luego de practicar eutanasia a los animales mediante dislocación cervical. El lavado fue recolectado mediante la exposición de la tráquea y se recuperó a partir de la inoculación de 1 mL de solución salina (0,9%) por vía intratraqueal, usando jeringuilla de 1 mL.

### Ensayo de ELISA para detección de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c

Placas de poliestireno (Maxisorp, Nunc) se recubrieron con anti-IgAh a una dilución (1/1000), que se obtuvo de suero de conejos inmunizados con IgAsh, purificada de calostro (Dirección de Biotecnología, Instituto Finlay) en solución de recubrimiento carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 (100  $\mu$ L/pozo). Las placas se incubaron durante 16 h, a 4 °C y, posteriormente, fueron bloqueadas con leche descremada al 3% en solución tampón fosfato, 0,15 M, pH 7,2, durante 1 h a 37 °C. Las muestras de saliva se diluyeron 1/2 en leche descremada al 1% en solución tampón fosfato-Tween 20 al 0,01%, y el lavado tráqueo-bronquial se aplicó puro. Como control negativo se emplearon las muestras que se obtuvieron del grupo no tratado, usando las mismas diluciones. Como control positivo se utilizó la IgAsh purificada de calostro humano. Cada muestra se aplicó por duplicado (50  $\mu$ L/pocillo) y cada placa se incubó durante 1 h a 37 °C. Las muestras se incubaron con anti-IgAh conjugado a peroxidasa (Sigma), a una dilución 1/1000 (50  $\mu$ L/pocillo), durante 1 h a 37 °C. La reacción se desarrolló con una solución de OPD (4 mg de OPD en 10 mL de solución tampón citrato 0,1 M, pH5 y 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y fue detenida con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N), luego de 20 min; la absorbancia fue determinada a 492 nm en un lector de ELISA (Multiscan, Multisof). Los resultados se expresaron como la media obtenida de los valores de la DO de cada muestra.

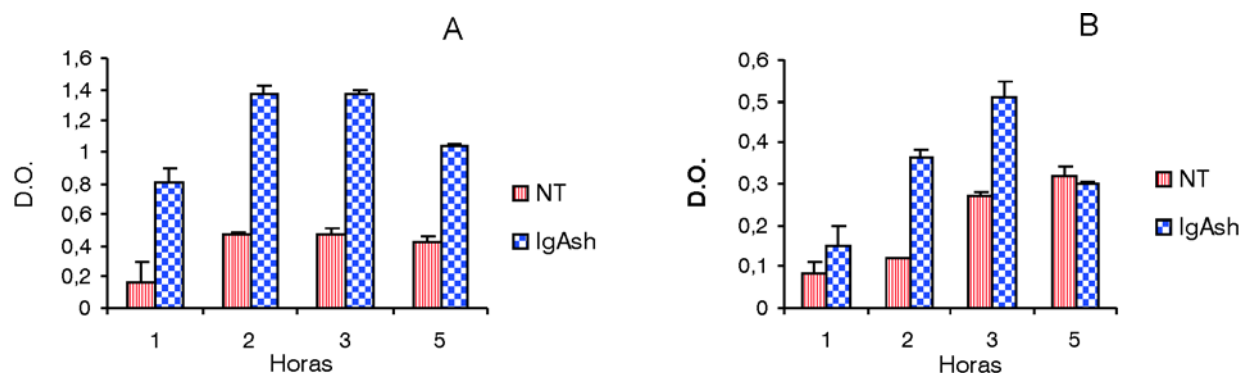
### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron empleando ANOVA de clasificación doble, en las muestras de todos los grupos y en los diferentes intervalos de tiempo. Se consideraron como significativos los valores de  $p < 0,05$ . Todos los datos fueron procesados utilizando el programa estadístico GraphPad Prisma 4.

## Resultados y Discusión

Los anticuerpos de tipo IgAs desempeñan un papel importante en los mecanismos de defensa tempranos contra los patógenos que invaden los tractos gastrointestinal, respiratorio y urinario (14). Generalmente actúan bloqueando la unión celular, facilitando el aclaramiento en la mucosa de patógenos microbianos aglutinados.

La presencia de la IgAsh purificada de calostro en los fluidos biológicos (saliva y lavado tráqueo-bronquial) fue determinada luego de la administración intranasal a ratón Balb/c mediante ELISA de captura (Fig.1).



**Fig. 1.** Distribución de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c. Los fluidos corporales (**A**: saliva y **B**: lavado tráqueo-bronquial), fueron colectados 1, 2, 3 y 5 h después de la inoculación por vía intranasal del anticuerpo y evaluados mediante ELISA de captura por unión a anti-IgAh. Difieren los resultados para  $p < 0,05$ , al comparar contra el control en todos los tiempos en la Fig. A, y difieren a las 2 y 3 h en la Fig. B. NT, no tratado; IgAsh, inmunoglobulina A secretora humana.

Los niveles de IgAsh presentes en la saliva de los animales del grupo IgA fueron superiores y estadísticamente significativos con respecto a los detectados en la saliva de los ratones inoculados con solución tampón fosfato, mostrándose este resultado en todos los intervalos de tiempo evaluados (Fig.1A).

Por otra parte, la presencia de IgAsh en el lavado tráqueo-bronquial fue determinada en los mismos intervalos de tiempo y se observaron diferencias estadísticamente significativas en los ratones que recibieron el anticuerpo, a las 2 y 3 h posteriores a la inoculación, con respecto a los niveles determinados en los ratones del grupo no tratado (Fig.1B).

En un estudio previo se evaluó la distribución en fluidos mucosales de un AcM de isotipo IgA contra la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis* (TBA61). Se determinaron los niveles de dicho anticuerpo 1, 3, 6 y 24 h posteriores a la inoculación por vía intranasal (4). Estos autores reportaron un incremento en los niveles de TBA61 en saliva a las 3 h de evaluación, con una posterior declinación en las muestras evaluadas a las 6 y 24 h. Al analizar los niveles de este AcM en las muestras de lavado tráqueo-bronquial, se encontró el mismo patrón que el observado en las muestras de saliva. Otro estudio más reciente evalúa la presencia de gammaglobulina humana comercial de tipo IgG (Intacglobin) en muestras de saliva, lavado tráqueo-bronquial y suero 1, 2, 3 y 5 h posteriores a la inoculación por vía intranasal a ratones Balb/c (15).

La presencia de gammaglobulina en las muestras de saliva fue detectada a partir de 1 h y hasta las 2 h, no siendo detectables al cabo de las 3 h posteriores a la inoculación. Sin embargo, a pesar de que en el lavado tráqueo-bronquial los niveles de la gammaglobulina, 1 h después de la inoculación, fueron mayores que en saliva, estos niveles descendieron a las 2 h, ascendiendo a las 3 h a niveles máximos y disminuyendo bruscamente hasta hacerse no detectables a las 5 h.

En nuestro estudio no podemos descartar la presencia de IgAsh en las muestras de lavado, donde los niveles no fueron significativos, debido a que los animales recibieron pilocarpina, con el objetivo de poder extraer las muestras de saliva. La pilocarpina es un agonista no específico de los receptores muscarínicos que provoca constricción de la musculatura lisa (16), particularmente la asociada a las glándulas donde se acumula y secreta la IgA.

Los lavados bronquiales se realizaron posterior a la extracción de las muestras de saliva con pilocarpina y por esta razón los niveles de IgA, presentes en las muestras de lavado tráqueo-bronquial, pueden estar subestimados. Otro factor que probablemente influyó en los bajos niveles de IgAsh detectados en las muestras de lavado es la dilución que se realizó durante su extracción. Este estudio se hizo basado en el esquema desarrollado por Olivares y cols (15). Sin embargo, en nuestro caso se mantienen elevados los niveles de IgAsh en las muestras de saliva al cabo de 5 h posteriores a la inoculación, por lo que consideramos necesario evaluar, además, tiempos mayores, con el objetivo de determinar el momento en el cual los niveles del anticuerpo administrado por vía intranasal desaparecen de los fluidos estudiados.

El hecho de que en nuestro estudio la IgAsh haya permanecido más tiempo en saliva con respecto a los dos estudios anteriores, puede deberse a la presencia del componente secretor en su estructura, el cual le aporta estabilidad a la molécula dimérica, protege la inmunoglobulina de la degradación por proteasas y le confiere propiedades mucoadhesivas, lo cual hace que sea retenida por más tiempo en las superficies mucosales (17).

La IgA reconoce constituyentes de las superficies micobacterianas y mediante esta habilidad tiene la posibilidad de influir en el curso de la infección intracelular, por virtud de interferir con las interacciones entre la bacteria opsonizada y la superficie mucosal (14).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, resulta interesante evaluar, con el uso de este modelo, el papel protector de la IgAsh como candidato terapéutico en la infección experimental con *M. tuberculosis*.

## Referencias

1. Strugnell RA, Wijnburg O. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nature Reviews Microbiology* 2010;8:656-67.
2. Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:311-40.
3. Monteiro RC, van de Winkel JG. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:177-204.
4. Balu S, Reljic R, Lewis MJ, Pleass RJ, McIntosh R, van Kooten C, et al. A novel human IgA monoclonal antibody protects against Tuberculosis. *The Journal of Immunology* 2011;186:2689-90.
5. Reljic R, Clark SO, Williams A, Falero-Díaz G, Singh M, Challacombe S, et al. Intranasal IFN gamma extends passive IgA antibody protection of mice against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection. *Clin Exp Immunol* 2006;143:467-73.
6. Williams A, Reljic R, Naylor I, Clark SO, Falero G, Singh M, et al. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology* 2004;111:328-33.
7. López Y, Yero D, Falero G, Olivares N, Sarmiento ME, Sifontes S, et al. Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against *Mycobacterium tuberculosis* 16 kDa protein in a model of progressive pulmonary infection. *International Journal of Medical Microbiology* 2009;299:447-52.
8. Rodríguez A, Tjarnlund A, Ivanyi J, Singh M, García I, Williams A, et al. Role of IgA in the defense against respiratory infections
9. Falero G, Challacombe S, Rahman D, Mistry M, Douce G, Dougan G, et al. Transmission of IgA and IgG monoclonal antibodies to mucosal fluids following intranasal or parenteral delivery. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:143-50.
10. Lemaitre-Coelho I, Yamakido M, Montgomery PC, Langendries AE, Vaerman JP. Selective excretion of IgA in rat bronchial secretions: Lack of significant contribution from plasma IgA. *Immunol Commun* 1992;11:441-53.
11. Mazanec MB, Nedrud JG, Liang XP, Lamm ME. Transport of serum IgA into murine respiratory secretions and its implications for immunization strategies. *J Immunol* 1989;142:4275-81.
12. Steinmetz I, Albrecht F, Haussler S, Brenneke B. Monoclonal IgA class-switch variants against bacterial surface antigens: Molecular forms and transport into murine respiratory secretions. *Eur J Immunol* 1994; 24:2855-62.
13. Álvarez N, Otero O, Falero G, Cádiz A, Marcet R, Carbonell AE, et al. Purificación de inmunoglobulina A secretora a partir de calostro humano. *VaccaMonitor* 2010;19:26-9.
14. Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 2006; 25:5467-84.
15. Olivares N, León A, López Y, Puig A, Cádiz A, Falero G, et al. The effect of the administration of human gamma globulins in a model of BCG infection in mice. *Tuberculosis* 2006; 86:268-72.
16. USP 29/NF 24. The United States Pharmacopeia/The National Formulary, United States Pharmacopoeia Convention Inc., Rockville, USA: USP 29/NF 24; 2006.
17. Phalipon A, Corthesy B. Novel functions of the polymeric immunoglobulin receptor: well beyond transport of immunoglobulin. *Trends Immunol* 2003;24:55-8.

## Biodistribution of the secretory IgA purified from human colostrum in biological fluids of Balb/c mice

### Abstract

The human secretory IgA (IgAsh) is structural and functionally released by the mucosal environment, with the ability to neutralize antigens and participating in promoting the binding and exclusion of them and preventing the adhesion of pathogens to mucosal epithelial surfaces. In this study, the biodistribution of hslgA purified from colostrum was evaluated, after being administered intranasally to BALB/c mice model and the levels of this immunoglobulin in several biological fluids were determined by ELISA. Results showed the presence of antibody in saliva samples from animals that received the IgAsh, which was significantly higher than levels found in samples from non-treated animals, at all time intervals. In samples of tracheobronchial lavage, high antibody levels were only obtained two and three hours after the inoculation of the animals of the group that received the IgAsh, compared to the non-treated group. According to the results obtained, we consider interesting to evaluate the protective role of this immunoglobulin as a therapeutic candidate against the infection by *M. tuberculosis* in a near future.

**Keywords:** Immunoglobulin A, antibodies, mucosal immunity.