

Inmunoglobulina A secretora humana, como
elemento capaz de modificar la infección por
Mycobacterium tuberculosis

**Tesis presentada en opción al Grado Científico
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. Nadine Alvarez Cabrera, MsC.

Ciudad Habana

2011

Inmunoglobulina A secretora humana, como
elemento capaz de modificar la infección por
Mycobacterium tuberculosis

**Tesis presentada en opción al Grado Científico
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. Nadine Alvarez Cabrera, MsC.

**Tutores: Dra. María E. Sarmiento García San Miguel
Dr. Armando Acosta Domínguez
Dr. Norazmi Mohd Nor**

**Asesores: Dr. Rogelio Hernández Pando
Dr. Juan Francisco Infante Bourzac**

Ciudad Habana

2011

SÍNTESIS

La inmunoglobulina A secretora es el anticuerpo más abundante en las secreciones mucosales, sin embargo, no ha sido evaluado el papel de esta inmunoglobulina obtenida de calostro humano en la protección contra patógenos micobacterianos. En este trabajo, nos propusimos como objetivo principal obtener la inmunoglobulina secretora humana (IgAsh) de calostro y evaluar su potencial protector frente a la infección con *Mycobacterium tuberculosis* en ratones. Se obtuvo IgAsh mediante una combinación de métodos cromatográficos. Se evaluó el reconocimiento de la IgAsh frente a antígenos de diferentes micobacterias, demostrándose una elevada reactividad. En el estudio de distribución en ratón Balb/c se constató que la IgAsh permanece en saliva y fluido tráqueo-bronquial durante varias horas posteriores a su inoculación por vía intranasal. La administración pasiva por vía intranasal de IgAsh antes de la infección con *M. tuberculosis*, así como la preincubación de la micobacteria con la IgAsh antes de ser administrada a los ratones por vía intratraqueal, reveló que este anticuerpo tiene capacidad protectora frente a la infección por este patógeno, mostrando reducción significativa de la carga bacteriana y las lesiones neumónicas en pulmón. Los resultados demuestran que la IgAs obtenida de calostro humano reconoce antígenos de micobacterias y posee un efecto profiláctico frente a la infección intratraqueal con *M. tuberculosis* en ratón.

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcP	Anticuerpo policlonal
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo
Ag	Antígeno
AM	Arabinomanano
APC	Células presentadoras de Antígenos
BCG	Bacilo de Calmette –Guérin
BCGr	BCG recombinante
CD	Célula dendrítica
CL	Cadena Ligera
CP	Cadena Pesada
CS	Componente secretor
DAB	Diaminobencidina
DCSING	Receptor de Células Dendríticas
DO	Densidad óptica
FcR	Receptor de Fc
Fcγ-RIIB	Receptor de inmunoglobulina G inhibidor en células B
HLA-DR	Antígenos Leucocitarios Humanos codificados por el segmento DR
INF-γ	Interferón-γ
IgAp	Inmunoglobulina A polimétrica
IgAs	Inmunoglobulina A secretora
IgAsh	Inmunoglobulina A secretora humana
IKK	Kinasa I kappa B
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
IRAK-1	Kinasa 1 Asociada al Receptor de Interleuquina-1
ITIM	Motivos inhibidores del inmuno-receptor de tirosina
ITAM	Motivos activadores del inmuno-receptor de tirosina
LAM	Lipoarabinomanano
LPS	Lipopolisacárido
MA	Macrófagos alveolares
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa
MyD 88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide
MDR	Multi-drogo-resistente
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK-kB	Factor Nuclear kappa activador de células B
NKT	Células Asesinas Naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	Orto-fenil-endiamina
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pIgR	Receptor polimérico de inmunoglobulina
PIM	Fosfatidil inositol manósidos
SCID	Ratones con Inmunodeficiencia Combinada Severa
SS	Solución Salina
SSTF	Solución salina tampón fosfato
SSTF-T	SSTF-T Solución salina tampón fosfato-Tween 20
TB	Tuberculosis

TCD4 +	Linfocito T CD 4+
Th	Linfocito T colaborador
TDM	Dimicolato de trealosa
TLCR C14 MD2	Receptor de Linfocitos T Citotóxicos
TLR	Receptor tipo toll
TMM	Monomicolato de trealosa
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRADD	Receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 asociado al dominio DEATH de la proteína
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
<i>Objetivos</i>	6
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
II.1 Magnitud de la TB a nivel mundial	9
II.2 Magnitud de la TB en CUBA	10
II.3 Primeras descripciones de la TB	10
II.4 Etiopatogenia de la TB	12
<i>II.4.1 Genes y antígenos</i>	14
II.5 Respuesta inmune celular frente a la TB	16
<i>II.5.1 Respuesta inmune innata</i>	16
<i>II.5.2 Paradigma clásico de respuesta inmune frente a la TB</i>	18
<i>II.5.3 Papel de los anticuerpos en el control de la infección por M. tuberculosis</i>	19
II.6 Calostro humano: Fuente importante de protección inmunológica	23
<i>II.6.1 Purificación de IgA a partir de calostro humano</i>	24
II.7 Algunos elementos del Sistema Inmune Mucosal	25
<i>II.7.1 Inmunidad mucosal respiratoria</i>	26
II.8 Inmunoglobulina A	27
<i>II.8.1 Estructura</i>	28
<i>II.8.2 Funciones biológicas</i>	30
<i>II.8.3 Regulación a nivel mucosal</i>	32
<i>II.8.4 Papel de la Inmunoglobulina A en la Tuberculosis. Avances</i>	33
II.9 Vacunas contra la Tuberculosis	35
<i>II.9.1 Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)</i>	35
<i>II.9.2 Nuevas vacunas en estudio contra la TB. Mejoramiento de la vacuna BCG</i>	36
II.10 Modelos animales de experimentación en el desarrollo de una nueva vacuna contra la TB	38

III. MATERIALES Y MÉTODOS	41
III.1 Consideraciones Éticas y Bioéticas	41
III.2 Obtención de calostro humano	41
III.3 Purificación de la Inmunoglobulina A	41
<i>III.3.1 Cromatografía de Intercambio Aniónico</i>	42
<i>III.3.2 Cromatografía de Exclusión Molecular</i>	42
<i>III.3.3 Identificación de la presencia de IgAsh</i>	42
<i>III.3.3.1 Dot blot</i>	42
<i>III.3.3.2 SDS-PAGE</i>	43
<i>III.3.3.3 Determinación de la presencia de IgG en la muestra de IgAsh purificada</i>	43
III.4 Estudio del reconocimiento de la IgAsh frente a antígenos de <i>M. smegmatis</i>, <i>M. bovis</i> BCG y <i>M. tuberculosis</i>	44
<i>III.4.1 Western blot</i>	44
<i>III.4.2 ELISA</i>	45
III.5 Estudio de la cinética de distribución de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c, luego de su administración por vía intranasal	45
<i>III.5.1 Inoculación de IgAsh a ratones Balb/c por vía intranasal</i>	45
<i>III.5.2 Extracción de muestras biológicas a diferentes tiempos posteriores a la inoculación</i>	46
<i>III.5.3 Determinación de la presencia de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c</i>	47
III.6 Evaluación de la capacidad protectora de la administración de IgAsh por vía intranasal, en un modelo murino de infección intratraqueal con <i>M. tuberculosis</i>	47
<i>III.6.1 Cepa de <i>M. tuberculosis</i></i>	47
<i>III.6.2 Inóculo bacteriano</i>	48
<i>III.6.3 Animales</i>	48
<i>III.6.4 Preincubación de <i>M. tuberculosis</i> con IgAsh</i>	48
<i>III.6.5 Inoculación de IgAsh por vía intranasal y posterior infección con <i>M. tuberculosis</i> por vía intratraqueal e inoculación de <i>M. tuberculosis</i> preincubado con IgAsh</i>	48
<i>III.6.6 Determinación de la carga bacteriana en el pulmón de ratones Balb/c</i>	50
<i>III.6.7 Estudio histopatológico y morfométrico en pulmón de ratones Balb/c</i>	50
<i>III.6.7.1 Procesamiento Histopatológico: Inclusión en parafina</i>	50
<i>III.6.7.2 Análisis morfométrico</i>	51
<i>III.6.8. Determinación de la expresión, en pulmón, de los genes IFN-γ, TNF-α, iNOS e IL-4, en ratones Balb/c</i>	51

III.6.8.1 <i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real</i>	51
III.6.9 <i>Determinación de la expresión de citoquinas en subpoblaciones linfocitarias de interés en pulmón de ratones Balb/c</i>	52
III.6.9.1 <i>Citometría de flujo</i>	52
III.7 Procesamiento estadístico	53
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
IV.1 Purificación de IgAsh a partir de calostro humano	54
IV.1.1 <i>Cromatografía de Intercambio Iónico</i>	54
IV.1.2 <i>Cromatografía de Exclusión Molecular</i>	55
IV.1.3 <i>Identificación de la presencia de IgAsh</i>	56
IV.1.3.1 <i>Dot blot</i>	56
IV.1.3.2 <i>SDS-PAGE</i>	57
IV.1.4. <i>Determinación de IgG en la muestra de IgAsh purificada</i>	58
IV.2 Estudio del reconocimiento de IgAsh frente a antígenos de <i>M. smegmatis</i>, <i>M. bovis</i> BCG y <i>M. tuberculosis</i>.	59
IV.2.1 <i>Western blot</i>	59
IV.2.2 <i>ELISA</i>	60
IV.3 Estudio de la cinética de distribución de IgAsh en muestras de suero, saliva y lavado tráqueo-bronquial, luego de su administración a ratones por vía intranasal	64
IV.4 Experimento de reto en ratón Balb/c	68
IV.4.1 <i>Determinación de la carga bacteriana en el pulmón</i>	69
IV.4.2 <i>Estudio morfométrico e hitsopatológico en pulmón de ratones Balb/c retados con <i>M. tuberculosis</i> por vía intratraqueal.</i>	73
IV. 4.2.1 <i>Estudio morfométrico</i>	73
IV. 4.2.2 <i>Estudio histopatológico</i>	75
IV.4.3 <i>Determinación de la expresión, en pulmón, de los genes IFN-γ, TNF-α, iNOS e IL-4, en ratones Balb/c</i>	82
IV.4.3.1 <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	82
IV. 4.4 <i>Determinación de la expresión de citoquinas en subpoblaciones linfocitarias de interés en pulmón de ratones Balb/c</i>	86
IV.4.4.1 <i>Citometría de flujo</i>	86
V. CONCLUSIONES	93
VI. RECOMENDACIONES	94
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
VIII. ANEXOS	
IX. PRODUCCION CIENTIFICA DEL AUTOR	

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa curable, transmisible y pandémica, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, que se estima afecta a 1/3 de la población mundial en la actualidad (WHO, 2008). Cada año se reporta globalmente un estimado de nueve millones de nuevos casos de TB, provocando de dos a tres millones de muertes, lo cual hace de *M. tuberculosis* la causa principal de mortalidad debido a un patógeno infeccioso (WHO, 2008). Sin embargo, los mecanismos efectores que conducen a la resistencia, susceptibilidad a la infección o enfermedad clínica, no son bien conocidos.

En la actualidad, la única vacuna en uso contra la TB es el Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), cepa atenuada de *M. bovis*, la cual ha sido ampliamente utilizada para prevenir la enfermedad y hasta el 2006, había sido administrada a más de 3 billones de personas (Stop TB, 2006). Esta vacuna tiene la desventaja de que sólo protege contra las formas severas de la enfermedad en la infancia, porque se ha demostrado que en países endémicos no protege contra la enfermedad pulmonar en adultos, a pesar de que ésta es la forma más común de la enfermedad y la responsable de su transmisión (Caminero, 2008). Otra desventaja importante de la vacuna es que posee una eficacia muy variable entre las poblaciones, oscilando desde una protección nula hasta un 80% (Fine, 1995). Las posibles causas de este amplio rango de protección han sido extensamente discutidas y continúan siendo objeto de investigación activa, aunque la teoría más aceptada se basa en el efecto de la vacunación con BCG, el cual puede verse enmascarado o inhibido por la importante influencia, que sobre la respuesta inmune, puede ejercer la exposición natural a las micobacterias ambientales (García y Barrera, 2004).

El impacto de la vacunación con BCG, parcialmente efectiva, está dirigido a reducir la incidencia de la TB en un rango del 40 al 50% para el 2050, tomando como punto de

partida el 2015. Este hecho es promisorio pero insuficiente para llegar a cubrir las expectativas mundiales de reducir la incidencia a un caso por cada millón de personas al año para el 2050 (Shreemanta y Kaufmann, 2010).

Teniendo en cuenta que alrededor de 2 millones de seres humanos son probablemente infectados con *M. tuberculosis* anualmente y que al menos el 10% de estos tiene altas probabilidades de desarrollar la enfermedad, las estrategias a seguir para la obtención de nuevas vacunas se han enfocado en tres vertientes importantes y diferentes (Thais y Kaufmann, 2010):

- vacunas de pre-exposición, que pudieran prevenir la infección primaria o evitar el desarrollo de la enfermedad activa después de la infección primaria
- vacunas de post-exposición, que pudieran erradicar la infección latente y/o contener la infección latente para evitar el desarrollo de la enfermedad activa
- vacunas terapéuticas, que pudieran ser aplicadas en pacientes tuberculosos para curar la enfermedad y/o infección

En la actualidad, la mayoría de los nuevos candidatos pertenecen al primer grupo de vacunas y hasta mayo del 2010, un total de once vacunas contra la TB se encontraban en diferentes fases de ensayo clínico (Shreemanta y Kaufmann, 2010). Las vacunas que han mostrado mejores resultados hasta el momento se agrupan en cuatro categorías: vacunas de BCG modificadas, vacunas de subunidades de *M. tuberculosis*, vacunas de vectores virales y vacunas de *M. tuberculosis* atenuado. Este último grupo incluye a *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium indicus pranii* y *Mycobacterium smegmatis* (Shreemanta y Kaufmann, 2010).

Tradicionalmente, se ha considerado a la inmunidad mediada por células como la respuesta efectiva en la protección contra la infección por *M. tuberculosis* y se ha restado

importancia al papel de los Acs en dicha protección. Luego de observar los resultados obtenidos al emplear la terapia sérica frente a algunas enfermedades, se evaluó el efecto de esta terapia frente a la TB, obteniéndose en un inicio resultados contradictorios. Sin embargo, en la actualidad, existen numerosos reportes que evidencian el papel de los Acs en la protección contra la TB (Teitelbaum y cols, 1998; Falero y cols, 2000; Olivares y cols, 2006; Olivares y cols, 2009; Balu y cols, 2011).

Entre las estrategias de evaluación en estudio se encuentra la posible potenciación del efecto de los Acs a través de candidatos vacunales administrados por vía mucosal que induzcan la síntesis de los mismos. Existen varios estudios que refuerzan este concepto incluyendo el hecho de que AcM IgAs dirigidos contra Acs de *M. tuberculosis*, al ser administrados por vía intranasal e intratraqueal, tienen un efecto protector contra la TB en modelos de infección experimental en ratón por vía intranasal, intratraqueal y aerosol (García y Barrera, 2004; Lewellys y cols, 2009; Shreemanta y Kaufmann, 2010). Guirardo y colaboradores demostraron que la administración pasiva de AcP protege contra la infección por *M. tuberculosis* en ratones SCID (Guirardo y cols, 2006). Adicionalmente, preparaciones comerciales de IgG humana (Intacglobin), han mostrado capacidad protectora en modelos de reto en ratón con *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*, después de su administración por vía intranasal e intratraqueal (Acosta y cols, 2003; Norazmi y cols, 2005; Olivares y cols, 2006; Olivares y cols, 2009). El grupo de Stephen Jolles realizó un estudio donde se evaluó la administración de varias dosis de gammaglobulina humana a ratones después de la infección con *M. tuberculosis* y se constató una disminución de las UFC en pulmones y bazo, así como un ligero incremento de las células CD8⁺ en los animales tratados (Roy y cols, 2005).

Tomando en consideración estos antecedentes, **¿tendrá la IgAs de calostro humano capacidad protectora frente a la infección con *M. tuberculosis*?**

Existen numerosos estudios que demuestran la protección conferida por la IgAsh frente a diversas infecciones, sobre todo aquellas que tienen lugar en el tracto gastrointestinal, así como evidencias del papel protector de AcM de IgA frente a la infección por *M. tuberculosis* en el modelo murino (Falero y cols, 2000; Balu y cols, 2011). Sin embargo no se ha estudiado la capacidad protectora de la IgAsh, obtenida a partir de calostro, frente a la infección con *M. tuberculosis*, a pesar del rol que esta Ig pudiera ejercer en la protección, teniendo en cuenta la abundante secreción de este isotipo en mucosa y su relación con la vía de entrada del patógeno al hospedero. Será necesario estudiar la reactividad de la IgAsh de calostro frente a los Ags de micobacteria, así como determinar su presencia en fluidos biológicos de ratón Balb/c en diferentes momentos luego de su administración. Los resultados derivados de ambos estudios permitirán sugerir qué mecanismo puede mediar la protección de la IgAsh frente a la infección con *M. tuberculosis*.

La demostración del papel protector de la IgAsh frente a la infección por *M. tuberculosis* abrirá las puertas a nuevas estrategias de control de la TB, basado en el uso de preparaciones de IgAs y el desarrollo de vacunas de nueva generación que estimulen la síntesis de este Ac a nivel mucosal.

Adicionalmente, **¿será adecuada la administración de la IgAsh por vía intranasal en la evaluación de su efecto protector a nivel pulmonar frente a la TB?**

La capacidad protectora de formulaciones de Acs frente a la infección con *M. tuberculosis* ha sido evaluada empleando diferentes rutas de administración, entre ellas, la vía intraperitoneal (Teitelbaum y cols, 1998), intravenosa (Roy y cols, 2005), intratraqueal (López y cols, 2009) e intranasal (Reljic y cols, 2006; Rodríguez y cols, 2005). De estas, las que más se asemejan a la vía natural de infección con la micobacteria son las vías intratraqueal e intranasal. La vía intratraqueal tiene como principal desventaja que al ser

aplicado el inóculo directamente en la tráquea, se pierde la posibilidad de que la micobacteria tenga contacto con el Ac desde su entrada en la mucosa nasal. En contraste, la vía intranasal posee numerosas ventajas como son su fácil administración, el hecho de que representa una vía no invasiva, no genera dolor, induce protección mucosal, permite una distribución adecuada del inóculo al pulmón, puede conferir protección en otros sitios mucosales (pulmón) y provee protección cruzada contra varios microorganismos mediante secreción de Acs a nivel mucosal (Birkhoff y cols, 2009).

Previamente ha sido explorada la vía respiratoria como puerta de entrada de la infección por aerosol y empleado el uso de AcM IgA aplicados por vía intranasal, para evaluar su posible papel protector frente a las infecciones por micobacterias (Falero y cols, 2000).

Dos elementos importantes avalan el uso de la vía intranasal: primero, estudios previos han demostrado que luego de la administración intranasal de AcM IgA y AcM IgG dirigidos contra Ags de *M. tuberculosis* y de formulaciones comerciales de IgG humana, se distribuyen adecuadamente en el árbol tráqueo-bronquial y con una permanencia en los fluidos durante varias horas luego de su administración (Falero y cols, 2000; Olivares y cols, 2006). Segundo, se ha demostrado que la administración de estas formulaciones además tiene un efecto protector antes del reto con micobacteria (Olivares y cols, 2009).

Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que: a), la vía por excelencia para la transmisión de la TB es a través del aparato respiratorio superior, ya sea por inhalación del esputo o la flema expectorada en forma de pequeñas gotas suspendidas en el aire o mezcladas con las partículas de polvo producidas por la tos, el estornudo o el habla de pacientes con focos tuberculosos pulmonares en comunicación con las vías aéreas (Knechel, 2009); b), los modelos animales propuestos para el estudio de la TB, sugieren que esta vía es la más adecuada para infectar a los animales en estudio (Falero y cols, 2000; Olivares y cols, 2009); y c), la IgA es la Ig predominante en el Sistema Inmune Mucosal, por lo que

se espera juegue un papel importante, junto a los factores no específicos, en la defensa contra las infecciones respiratorias (Norazmi y cols, 2005; Roy y cols, 2005).

Por todo lo antes mencionado, consideramos que existen nuevas posibilidades, no exploradas hasta el momento, que probablemente aportarán mayor información sobre la influencia que pudiera tener la IgAs en la mucosa respiratoria durante la infección con *M. tuberculosis*. Adicionalmente, su potencial uso profiláctico, terapéutico y la aplicación de estos conocimientos pueden dar lugar a formulaciones vacunales que induzcan la producción de anticuerpos.

A pesar de la importancia potencial para la protección y el desarrollo de vacunas, aún existen pocas evidencias acerca del papel de los Acs en la protección frente a la infección por *M. tuberculosis*, pues a pesar de que se ha evaluado y demostrado el papel protector de los Acs IgG e IgA de ratón y de la IgG humana en modelos de infección con *M. tuberculosis* en ratones, el papel protector de la IgAsh en dicho modelo experimental no ha sido demostrado.

Teniendo en cuenta que:

- ❖ La IgAs juega un papel fundamental y protagónico a nivel mucosal frente a diferentes microorganismos
- ❖ Formulaciones de AcM de IgA protegen contra *M. tuberculosis* en el modelo murino
- ❖ 1/3 de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis*
- ❖ La vía aerógena es la principal fuente de infección por *M. tuberculosis*
- ❖ Existe una elevada exposición a micobacterias ambientales
- ❖ Gran parte de la población es vacunada con BCG al nacer

Nos planteamos como **hipótesis** que:

La inmunoglobulina A secretora obtenida de calostro humano, al ser administrada

de forma pasiva por vía intranasal, pudiera reconocer antígenos de micobacterias y permanecer en fluidos biológicos de ratón Balb/c, así como ejercer un efecto profiláctico frente a *Mycobacterium tuberculosis*, en un modelo de infección intratraqueal murino.

Para dar respuesta a nuestra hipótesis, nos formulamos los siguientes **objetivos**:

1. Obtener IgAs a partir de calostro humano
2. Evaluar la reactividad de IgAsh frente a Ags de micobacterias
3. Describir la cinética de distribución de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c, luego de su administración por vía intranasal.
4. Evaluar la capacidad protectora de la administración de IgAsh por vía intranasal, en un modelo murino de infección intratraqueal con *M. tuberculosis*.

Para cumplir los objetivos formulados, se desarrollaron las siguientes **tareas**:

Objetivo 1

- a. Purificación de IgAsh a partir de calostro e identificación.
- b. Determinación de la presencia de IgG en la muestra de IgAsh purificada.

Objetivo 2

- a. Estudio del reconocimiento de IgAsh frente a Ags de *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*

Objetivo 3

- a. Inoculación de IgAsh a ratones Balb/c por vía intranasal.
- b. Extracción de muestras biológicas a diferentes tiempos posteriores a la inoculación.
- c. Determinación de la presencia de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c.

Objetivo 4

- a. Inoculación de IgAsh por vía intranasal y posterior infección con *M. tuberculosis*

- por vía intratraqueal, a ratones Balb/c.
- b. Inoculación de *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh por vía intratraqueal, a ratones Balb/c.
 - c. Determinación de la carga bacilar en pulmón de ratones Balb/c inoculados por vía intranasal con IgAsh y retados con *M. tuberculosis* por vía intratraqueal.
 - d. Determinación de la carga bacilar en pulmón de ratones Balb/c retados con *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh por vía intratraqueal.
 - e. Estudio morfométrico e histopatológico en pulmón de ratones Balb/c inoculados por vía intranasal con IgAsh y retados con *M. tuberculosis* por vía intratraqueal.
 - f. Estudio morfométrico e histopatológico en pulmón de ratones Balb/c retados con *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh por vía intratraqueal.
 - g. Determinación de la expresión en pulmón, de los genes de IFN- γ , TNF- α , iNOS e IL-4, en ratones Balb/c inoculados por vía intranasal con IgAsh y retados con *M. tuberculosis* por vía intratraqueal.
 - h. Determinación de la expresión en pulmón, de los genes de IFN- γ , TNF- α , iNOS e IL-4, en ratones Balb/c retados con *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh por vía intratraqueal.
 - i. Determinación de la expresión de citoquinas en subpoblaciones linfocitarias de interés en pulmón, de ratones Balb/c inoculados por vía intranasal con IgAsh y retados con *M. tuberculosis* por vía intratraqueal.
 - j. Determinación de la expresión de citoquinas en subpoblaciones linfocitarias de interés en pulmón, de ratones Balb/c retados con *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh por vía intratraqueal.

NOVEDAD CIENTÍFICA

La **novedad científica** del presente trabajo radica en que:

1. Por primera vez, se evaluó y demostró la reactividad de la IgAs obtenida de calostro humano frente a Ags de diferentes micobacterias.
2. Por primera vez, se evaluó y demostró la capacidad protectora de la IgAs obtenida de calostro humano frente a la infección experimental con *M. tuberculosis*, en un modelo murino de infección pulmonar progresiva.

IMPACTO SOCIO-ECONÓMICO

Los resultados obtenidos permitirán su aplicación en el desarrollo de formulaciones de Acs para la prevención y el tratamiento de la TB, así como en el desarrollo de nuevas vacunas que estimulen la producción de Acs específicos. Adicionalmente, esta formulación podrá aplicarse de forma conjunta con el tratamiento convencional, fundamentalmente en casos de cepas MDR y de TB latente.

BREVE DESCRIPCION DEL CONTENIDO DE LA TESIS

Este trabajo consta de 9 capítulos: Introducción (8 páginas), Revisión Bibliográfica (32 páginas), Materiales y Métodos (13 páginas), Resultados y Discusión (39 páginas), Conclusiones (1 página), Recomendaciones (1 página), Anexos (2 páginas), Referencias Bibliográficas (16 páginas) y Producción científica del autor (2 páginas). Además en las tres primeras páginas, se muestra una página de índice con los epígrafes y subepígrafes de la tesis, seguido de una página de síntesis y luego, dos páginas de abreviaturas empleadas en el documento.

HISTORIAL DE DISCUSIONES DE LA TESIS

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en dos publicaciones nacionales, una publicación internacional y forman parte de un capítulo de un libro dedicado al tema de la

tuberculosis. Además, los mismos han sido presentados en eventos nacionales e internacionales, han permitido obtener la distinción de Sello Forjadores del Futuro y forman parte de una tesis en opción al título de Especialista de Primer Grado en Inmunología.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Magnitud de la TB a nivel mundial

La TB en la actualidad constituye un problema de salud crítico y de difícil erradicación. La enfermedad constituye la primera causa de muerte asociada a enfermedades infecciosas y la OMS estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo de la TB (**Fig.1**). Cada año se reportan alrededor de 3 millones de muertes a causa de esta enfermedad, cifra ésta que se ve incrementada por la asociación de la TB con el VIH. Esta asociación se considera una combinación mortal, donde la TB constituye una de las enfermedades oportunistas más comunes en los pacientes con VIH y resulta muy difícil establecer un tratamiento eficaz contra ambas enfermedades en un mismo paciente.

Estimated TB incidence rates, by country, 2009

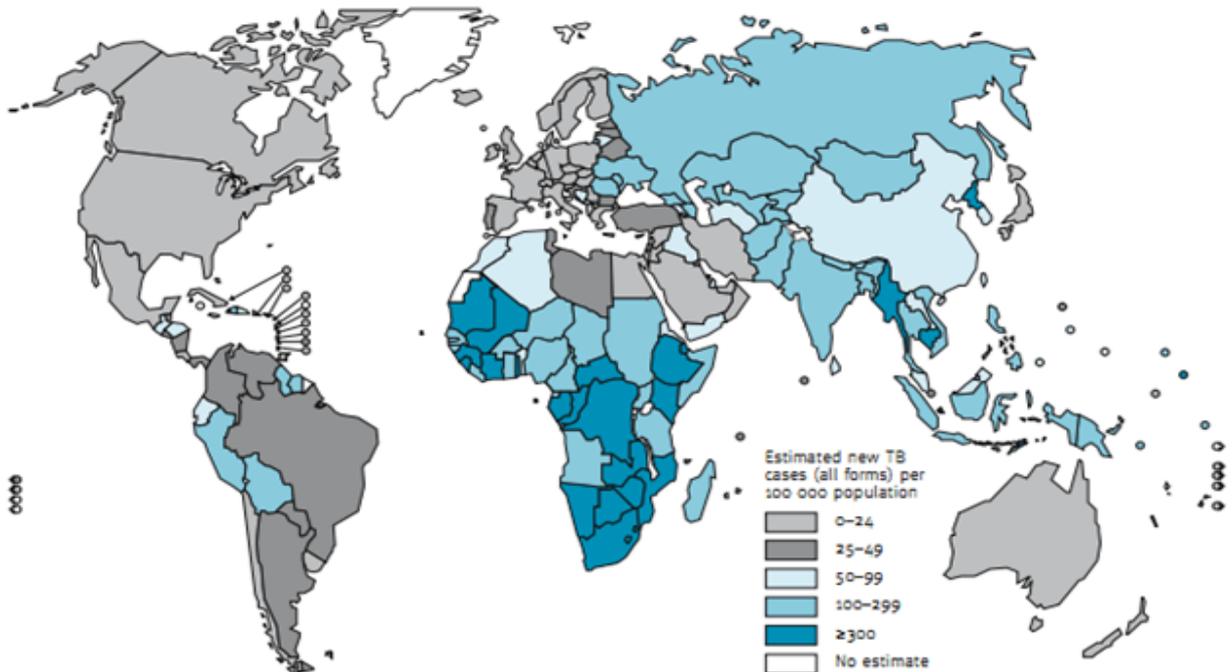


FIGURA 1. Incidencia de la TB a nivel mundial según datos de la Organización Mundial de la Salud. Tomado de Global TB Control Report 2010.

A esto se suma el hecho de que la mayoría de las pruebas diagnósticas para detectar la TB resultan fallidas en estos pacientes, lo cual dificulta el establecimiento de un método diagnóstico eficaz en las etapas tempranas de la infección por *M. tuberculosis* (WHO, 2008).

II.2 Magnitud de la TB en CUBA

En nuestro país, la TB constituía una de las primeras causas de muerte antes de 1959, ocupando el 10^{mo} lugar (González y cols, 2007). Sin embargo, con el Triunfo de la Revolución, se implementó el Programa Nacional del Control de la TB, el cual comprendía estrategias claves dirigidas a la detección temprana de los casos y a la erradicación del número de muertes por esta enfermedad. La incidencia de la TB en Cuba ha mantenido una tendencia descendente asociada a las estrategias de tratamiento ambulatorio estrictamente supervisado (TES/DOT), desde 1971, y de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES/DOTS), desde 1982 hasta el presente (González y cols, 2007).

En 2008 la incidencia de TB en todas sus formas notificadas era de 6,9 por 100 000 habitantes (Anuario Estadístico de Salud, 2008). En general, la OPS considera que los países con tasas de incidencia de TB estimada menores de 25 por 100 000 habitantes tienen una situación favorable (OPS, 2006). El anuario estadístico de salud cubano del 2009 presenta la incidencia en tasas por 100 000 mil habitantes de 14.2, 11.6, 5.1 y 5.9 en los años 1975, 1980, 1990 y 2009, respectivamente. En el 2009 se diagnosticaron 666 casos nuevos de TB en el país, reportándose la mayor incidencia en las personas mayores de 15 años y siendo Ciego de Ávila y Ciudad Habana las provincias más afectadas, con una incidencia 10.5 y 8.2 por 100 000 habitantes, respectivamente. La

prevalencia de la enfermedad a nivel nacional al concluir el 2009 fue de 5.0 por 100 000 habitantes (Anuario Estadístico de Salud, 2009).

II.3 Primeras descripciones de la TB

La TB es una de las enfermedades más antiguas que ha afectado al hombre, existiendo constancia de su presencia desde hace 15 000 a 20 000 años. Sus orígenes se remontan al período paleolítico, y se ha constatado que antes de infectar al hombre, era causante de la enfermedad en los animales. La TB fue documentada en Egipto, la India, y China, en épocas tan tempranas como 5000, 3300 y 2300 años atrás, respectivamente. Anormalidades esqueléticas típicas, incluyendo deformidades de Pott, fueron encontradas en momias egipcias y andinas (**Fig.2**), así como en pinturas referidas a esta enfermedad realizadas por los primitivos egipcios y el arte precolombino (Leakey, 1993; Etxeberria y cols, 2000).

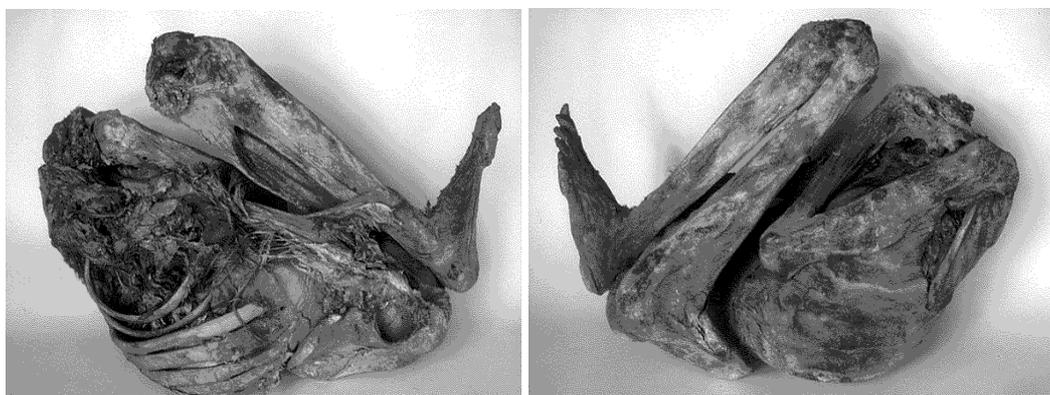


FIGURA 2. Deformaciones esqueléticas producidas por tuberculosis en una momia prehispanica de colombia. Tomado de Etxeberria y cols, 2000.

La enfermedad fue difundida en Egipto y Roma, existió en América antes de la llegada de Colón, y en Burneo antes de cualquier contacto europeo (Barrera, 2007). A lo largo de la historia, la TB ha sido conocida bajo diferentes denominaciones, entre estas el término de

consunción, tisis, escrófula, mal de Pott, mal del rey o plaga blanca (De la Parte-Pérez y cols, 2001). Hipócrates identificó a la tisis como la enfermedad más diseminada del momento, la cual se manifestaba comúnmente entre los 18 y 35 años de edad y casi siempre conducía a la muerte.

La TB epidémica en Europa, comenzó probablemente en los inicios del siglo XVII. La muerte por TB fue considerada inevitable y, alrededor de los años 1650, fue la causa principal de mortalidad. La epidemia se propagó lentamente por exploración y colonización. El índice de muerte se incrementó rápidamente, y en 1886, alcanzó 9000 por 100000 habitantes (Bates y Stead, 1993).

El nombre "TB" fue acuñado en 1839 por el profesor de medicina alemán Johann Lukas Schönlein (1793-1864), empleado para describir enfermedades relacionadas con tubérculos, pero consideró la *escrófula* y la *tisis* como entidades independientes. Las referencias más tempranas sobre la naturaleza infecciosa de la TB aparecieron en la literatura médica italiana del siglo XVII (Caminero, 2008).

II.4 Etiopatogenia de la TB

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa, causada por diversas especies del género *Mycobacterium*, todas ellas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. La especie más importante y representativa es *M. tuberculosis* o Bacilo de Koch. Otras micobacterias causantes de TB son *M. bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* y *Mycobacterium microti* (Miltgen y cols, 2002). Sin embargo, no todas las bacterias del complejo *M. tuberculosis* tienen el mismo potencial de transmisión e infectividad. En el presente, la cepa de *M. tuberculosis* de mayor virulencia circulante es la Beijing (Caminero y cols, 2001).

M. tuberculosis pertenece al orden Actinomycetales, a la familia Mycobacteriaceae y al género Mycobacterium (Rastogi y cols, 2001). Es una bacteria Gram+ y los bacilos se caracterizan por ser delgados, ligeramente rectos o curvos y con un tamaño aproximado de 1-10 x 0.2-0.6 μm .

Es un microorganismo intracelular facultativo, aerobio, de crecimiento lento (de 12 a 24 hrs), inmóvil, no esporulado, que se replica dentro de los fagosomas de los macrófagos (Barrera, 2007). Su pared celular está compuesta por 3 capas muy complejas desde el punto de vista químico y muy diferente de las que forman parte del resto de las micobacterias. La pared es compleja, compuesta por proteínas, polisacáridos, un elevado contenido de lípidos (>60%) y diferentes y numerosos ácidos micólicos, los cuales se encuentran unidos covalentemente a glicolípidos tales como α,α -trealosa dimicolato (TDM) y α,α -trealosa monomicolato (TMM) (Knechel, 2009). Esta barrera celular protege al microorganismo del medio ambiente, contribuye a la persistencia de la enfermedad y a la resistencia frente a la acción de muchos antibióticos. Adicionalmente, la pared contribuye a la longevidad de la micobacteria, inicia las reacciones inflamatorias del huésped y juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Koneman, 1992).

Los lípidos presentes en la pared celular le ofrecen impermeabilidad a la célula contra drogas comunes y tinciones ácidas, por lo que se consideran los responsables del carácter ácido-alcohol resistente de estas bacterias (Knechel, 2009). Además su pared celular se caracteriza por la elevada presencia de sustancias ceras y grasas. *M. tuberculosis*, puede ocasionalmente afectar a primates y mamíferos domésticos. Protegido de la luz solar, este microorganismo puede permanecer viable en el esputo durante semanas o meses y en partículas desecadas y adherido a partículas de polvo, constituye un aerosol contaminante durante 8-10 días. El bacilo es sensible a la luz solar y

ultravioleta y fácilmente destruible mediante el calor y la temperatura de pasteurización y se tiñe mal con la coloración de Gram, por lo que para visualizarlo es necesaria la tinción de Zielh-Neelsen, aunque actualmente se emplean además métodos de fluorescencia (Knechel, 2009).

La receptividad para la infección tuberculosa es universal. El organismo virgen de infección, opone como única resistencia a la agresión bacteriana los mecanismos específicos (*barrera cutánea-mucosa, acción muco-ciliar y reacción inflamatoria*). Según el criterio de Yumans, el bacilo tuberculoso es un germen oportunista, porque para producir enfermedad, necesita que el huésped tenga algún grado de deterioro de la inmunidad celular. Así, la infección por *M. tuberculosis* es frecuente en personas con infección por VIH, desnutrición, diabetes, abuso del alcohol, consumo de drogas, tratamiento con corticoides o inmunosupresores. Las personas más vulnerables a enfermar son generalmente niños pequeños, adolescentes y adultos mayores. El riesgo de adquirir infección tuberculosa se relaciona con la infectividad de la fuente (*enfermedad cavitaria o enfermo con baciloscopía positiva al directo*), la proximidad del contacto, la duración de la exposición y la densidad bacteriana en el ambiente que se respira (Knechel, 2009).

Se considera que *M. tuberculosis* puede penetrar al organismo por tres vías distintas, siendo la vía respiratoria la principal puerta de entrada y crucial en la transmisión de la enfermedad de persona a persona. Por su parte, las vías digestiva y genitourinaria son mucho menos frecuentes (Flynn y Chan, 2003). La infección pulmonar se adquiere mediante la inhalación de pequeñas partículas (*aerosoles*) que contienen los bacilos de *M. tuberculosis*, los cuales pueden ser liberados por un paciente con infección tuberculosa (Cooper y cols, 1993).

A diferencia de otras enfermedades infecciosas, la TB no tiene un período de incubación específico y diversos estudios han mostrado que un episodio único no confiere inmunidad

duradera. En condiciones desfavorables, el bacilo es capaz de entrar a una fase de latencia, modificando su metabolismo y crecimiento según las condiciones microambientales, y pasando de un rápido crecimiento aerobio a un crecimiento lento microaerofílico. De esta manera, la micobacteria puede mantenerse viable y latente en el organismo durante largos períodos, hasta que el estado defensivo del hospedero sea favorable para multiplicarse y producir los síntomas de la enfermedad (James y cols, 2000).

II.4.1 Genes y antígenos

La identificación de Ags y otros componentes inmunogénicos que tienen una expresión similar en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*, es una herramienta clave para el desarrollo de nuevas y mejores vacunas y pruebas diagnósticas para controlar la TB. Los estudios proteómicos en cepas clínicas y de laboratorio de *M. tuberculosis*, representan una buena estrategia para identificar Ags potenciales que están bien representados dentro de los diferentes aislados clínicos y permiten la identificación de las proteínas más abundantes expresadas en este bacilo. Esta es una de las primeras etapas en la identificación de proteínas inmunogénicas que son reconocidas por la mayor parte de la población infectada con *M. tuberculosis* y pueden ser seleccionadas para evaluar la inmunidad protectora.

La identificación de proteínas específicas en cepas virulentas de *M. tuberculosis*, pero no en BCG o en otras cepas avirulentas, son blancos importantes para el desarrollo de vacunas (Smith, 2003). En este sentido, los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG han sido comparados en análisis bidimensional y se han identificado puntos únicos para *M. tuberculosis* (Smith, 2003). Se identificaron proteínas específicas de esta micobacteria como la L-alanina deshidrogenasa (*Ag de 40 kDa*), isopropil malato sintasa

(Rv3710), nicotinato-nucleótido pirofosfatasa (Rv1596), Mpt64 (Rv1980c) y dos proteínas hipotéticas conservadas (Rv2449c y Rv0036c) (Smith, 2003).

Esat-6, Cfp10 y otras proteínas han sido identificadas igualmente sólo en *M. tuberculosis* (Trajković, 2004). Además, otras proteínas que no han sido predichas como ausentes en el genoma de BCG, han sido identificadas sólo en *M. tuberculosis* e incluyen la chaperona GroES, el factor de elongación EF-Tu (Tuf), Rv3269 y siete proteínas hipotéticas (Rv0020c, Rv1684, Rv1893, Rv3046c, Rv3881c, Rv1198 y Rv1793). Interesantemente, los niveles de L-alanina deshidrogenasa (Ald) y el factor de elongación EF-Tu, tienen un mayor nivel de expresión en ambientes con baja tensión de oxígeno, lo cual sugiere que estas proteínas son expresadas durante el estadio latente de la infección (Yuan y cols, 1996). Sin embargo, un candidato de BCGr que expresa el gen Ald, no promueve la respuesta protectora observada sólo con BCG (Skjot y cols, 2000).

Por otro lado, la identificación de Mpt64 como proteína única de *M. tuberculosis*, ha llevado al desarrollo de nuevos candidatos vacunales de BCGr que actualmente están siendo estudiados para evaluar su capacidad protectora (Lewellys y cols, 2009). Mpt64 es también considerada una de las proteínas con mayor potencial como Ag protector, además del Ag85B, el Ag de 38 kDa, Esat-6 y Mtb8.4 (Norazmi y cols, 2005). Particularmente, se reportó que una vacuna de BCG recombinante que sobre-expresa Ag85B, Mtb8.4 y un péptido de Mpt64, tiene un efecto protector en el modelo murino, similar al BCG o mejor que el BCGr que sólo sobre-expresa Ag85B (Reljic y cols, 2006a). Algunas proteínas son reconocidas durante el crecimiento *in vivo* o durante el crecimiento en condiciones que mimetizan el ambiente del hospedero correspondiente a las proteínas de estrés térmico. Se ha demostrado que la sobre-expresión de estas proteínas reduce la supervivencia de la micobacteria durante la fase crónica de la infección. En particular, la

reducción de la carga bacteriana en el bazo de los ratones infectados es similar a la obtenida después de la inmunización con BCG (Reljic y cols, 2006a).

II.5 Respuesta inmune celular frente a la TB

II.5.1 Respuesta inmune innata

La naturaleza ha provisto al espacio alveolar de mecanismos innatos de defensa que involucran a los MA, las CD, los neutrófilos, los linfocitos B, las células epiteliales, las células alveolares tipo I y tipo II y factores solubles como mucina, lisozima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2, Igs y proteínas del complemento. La función fundamental de estos componentes consiste en mantener la homeostasis pulmonar y favorecer la eliminación de partículas o bacterias que entren al hospedero a través del tracto respiratorio (Freguson y Schelesinger, 2000; van Crevel y cols, 2002). La llegada de *M. tuberculosis* hasta el espacio alveolar significa que ha superado la barrera mucociliar del tracto respiratorio; sin embargo, en ese nuevo ambiente se enfrenta a los MA, los cuales constituyen la primera línea de defensa. Este primer contacto es crucial ya que va definir el control de la infección o, por el contrario, el desarrollo de la enfermedad. La fagocitosis de *M. tuberculosis* es principalmente llevada a cabo por los MA a través de diversos mecanismos y es favorecida por el factor surfactante A producido por las células epiteliales alveolares tipo II, ya que aumentan la interacción entre la micobacteria y los MA (Aderem y Underhill, 1999). Al parecer, *M. tuberculosis* ha desarrollado diferentes mecanismos para entrar a los MA, ya que induce su propia fagocitosis utilizando diferentes receptores como son: CD14, receptores para Fc cuando la micobacteria ha sido opsonizada con Acs producidos por los linfocitos B en el pulmón y receptores de complemento, ya que al activarse la vía alterna del complemento C3b y C3bi son depositados en la superficie de la micobacteria y éstos son reconocidos por CR1 y

CR3/CR4, presentes en la superficie de los MA. En ausencia de éstos factores (C3b y C3bi), un componente de la superficie de *M. tuberculosis* muy parecido a C4 puede unirse directamente a C2a para formar C3 convertasa que actúa sobre C3 y produce C3b que se une a la superficie de la micobacteria y facilita la unión con CR1. Adicionalmente, existen también receptores de manosa que interaccionan con LAM, receptores *scavenger* y receptores para el surfactante A (Doherty y Ardite, 2004; Strieter y cols, 2002).

Algunos componentes de la micobacteria (*arabinogalactanos*, *peptidoglicanos*, *LAM*, *proteínas*) pueden interactuar con los TLR2/TLR4 de los MA e inducir la producción de IL-1b y TNF- α (Lang y Glatman-Freedman, 2006). Tanto IL-1b/ IL-1R como el complejo Ag/TLCR/C14/MD2, utilizan vías comunes de señalización intracelular que incluyen principalmente la molécula adaptadora MyD88. Sin embargo, algunos autores afirman que no es completamente necesaria la presencia de esta molécula para iniciar una respuesta inmune, no siendo así en el caso de los TLR's, donde se ha demostrado que los ratones knock-out para estos receptores muestran una susceptibilidad a la infección muy superior a la que muestran los ratones normales (Wang y cols, 2005). Existen también otras moléculas involucradas en la señalización de la respuesta inmune en TB tales como IRAK-1, TRAF6, NIK, IKK, NK-kB, mientras que el TNF-a interacciona con su receptor e inicia la señalización con proteínas diferentes (TRADD, TRAF2), teniendo el mismo factor de transcripción (NF-kB) e induciendo la expresión de los genes que codifican para la ciclo-oxigenasa, moléculas de adhesión celular, iNOS, proteínas de fase aguda, citoquinas y quimioquinas (Lang y Glatman-Freedman, 2006).

Durante la fagocitosis, la micobacteria es incluida en un fagosoma y destruída en el fagolisosoma mediante la producción de óxido nítrico (ON) y al mismo tiempo, los macrófagos son capaces de procesar Ags micobacterianos y presentarlos a los linfocitos T CD4⁺ (MCH II) y CD8⁺ (MCH I) ó CD1 por lo que los MA, además de ser células efectoras,

funcionan como APC y pueden definir el curso de la respuesta de inmunidad adaptativa (Th1 o Th2) (Orme y Cooper, 1999). Este es el paso de transición entre la respuesta de inmunidad innata y la respuesta de inmunidad adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico entre diferentes células y la secreción de factores solubles como las citoquinas y quimioquinas. En estudios recientes se ha observado que *M. tuberculosis* inhibe la expresión del gen HLA-DR, gen cuya expresión está modulada positivamente, lo cual implica una baja expresión de moléculas MHC en la superficie del macrófago y esto conlleva a favorecer el establecimiento de la infección latente, porque no hay una adecuada presentación a linfocitos T (Orme y Cooper, 1999).

II.5.2 Paradigma clásico de respuesta inmune frente a la TB

Tradicionalmente se ha considerado que la respuesta inmune celular es la que ofrece una elevada protección contra la infección por *M. tuberculosis*. Este concepto está basado en el paradigma clásico Th1/Th2, el cual apoya la hipótesis de que frente a los patógenos intracelulares se desarrolla exclusivamente una respuesta inmune celular, de tipo Th1, mientras que frente a los patógenos extracelulares se desarrolla una respuesta inmune humoral, de tipo Th2. Sin embargo, en la actualidad es ampliamente aceptado que no existe una respuesta exclusiva de un tipo u otro frente a los patógenos, sino que se establece una combinación de ambas, donde una suele prevalecer sobre la otra.

Frente a la infección por *M. tuberculosis*, es muy importante la respuesta inmune innata porque muchos individuos permanecen sin enfermar aun habiendo estado expuestos al bacilo (van Crevel y cols, 2002). Se ha descrito que de manera general, se producen tres eventos frente a este patógeno (Pasquinelli, 2008). Un por ciento reducido de pacientes experimenta una cura total, pero ésta suele ocurrir con frecuencia desconocida. Otro de los eventos es la infección aguda, la cual es frecuente en aquellos pacientes

inmunodeprimidos, sobre todo pacientes de VIH, diabetes o aquellas personas que abusan del consumo del alcohol y las drogas (Kaufmann y McMichael, 2005). Pero lo que ocurre de manera general, es que luego de la infección con el bacilo, estos son fagocitados por los macrófagos, CD y macrófagos derivados de monocitos (Pasquinelli, 2008). En la fagocitosis intervienen los receptores situados en la superficie de los macrófagos humanos tales como los receptores de manosa, receptores de complemento y receptores *scavenger*. En las CD, es el receptor DC-SIGN el que media la fagocitosis (Berrington y Hawn, 2007). Además de la fagocitosis, es importante el reconocimiento de *M. tuberculosis* o de sus productos lo cual ocurre básicamente por los TLR, situados en la superficie de las células fagocíticas donde se conoce que los principales son el TLR 2, 1, 6, 9 y probablemente el 4 (Lang y Glatman-Freedman, 2006).

Una vez fagocitados los bacilos, estos comienzan a desarrollar una serie de mecanismos dirigidos a evitar su propia eliminación intracelular (Dascher y Brenner, 2005). Estos mecanismos de defensa son llevados a cabo por los Ags de naturaleza proteica y lipídica del patógeno. Una vez desarrollados estos mecanismos, el bacilo logra inhibir la fusión fago-lisosomal y con esto, la activación y maduración del macrófago, por lo cual no se producen los reactivos libres del oxígeno y el nitrógeno, los cuales actúan como factores antimicrobianos. Así, los bacilos inducen la apoptosis de los macrófagos, conduciendo a la generación de vesículas apoptóticas que contienen los fragmentos antigénicos micobacterianos. Estas vesículas son luego capturadas por las CD, células que tienen la capacidad de realizar presentación cruzada en el contexto MHC clase I y a células restringidas a CD1, tanto a linfocitos convencionales como no convencionales (Dascher y Brenner, 2005). Estos van a producir IFN- γ , citoquina que junto con el TNF- α producido por los macrófagos infectados, induce la activación y maduración de macrófagos, de

manera que estos puedan liberar los factores antimicrobianos que llevan a cabo la eliminación intracelular del patógeno (Cooper y cols, 1993; Flynn y cols, 1993). Ante las respuestas agresivas del sistema inmune del hospedero, la bacteria desarrolla mecanismos de persistencia dentro de las células fagocíticas, haciéndose latente metabólicamente y pasando de un crecimiento en condiciones aeróbicas a un crecimiento con ciclos replicativos, infrecuentes o limitados, en ambientes microaerófilicos (Pasquinelli, 2008). En este estado de latencia, el bacilo puede permanecer durante largos períodos de tiempo, incluso años, logrando ser invisible ante los mecanismos de defensa del sistema inmune. La latencia puede ser revertida mediante una segunda infección o bajo condiciones del sistema inmune apropiadas para la reactivación de la infección, tal como la inmunodepresión (Pasquinelli, 2008).

II.5.3 Papel de los anticuerpos en el control de la infección por M. tuberculosis

El papel de los Acs se ha considerado como no relevante en la protección frente a la infección por *M. tuberculosis* (Hussain y cols, 2001). En la actualidad la situación de la TB es complicada debido a que constituye una enfermedad re-emergente, cuya incidencia y número de defunciones por esta causa aumentan y se agrava el cuadro epidemiológico por la co-infección de *M. tuberculosis* y el VIH. A esto se suma la existencia de cepas cada vez con mayor multi-resistencia a las drogas empleadas en el tratamiento de la TB y el hecho de que la eficacia de la única vacuna licenciada para su uso en humanos, posee una elevada variabilidad. El papel de los Acs en la protección contra la TB ha sido poco explorado y constituye una hipótesis cuyos resultados podrían ser aplicados en la profilaxis y terapia de la TB.

Aún persiste el pensamiento de que la perpetuación de la infección por *M. tuberculosis* está determinada por el balance entre el pequeño número de bacterias viables que

sobreviven en el sitio de la infección y los linfocitos T con actividad cooperadora o citotóxica (Glatman-Freedman y Casadeval, 1999). Como resultado, la gran mayoría de las vacunas experimentales que se desarrollan contra la TB, están encaminadas a conferir protección mediante la estimulación del sistema inmune celular, con el objetivo de controlar la proliferación de los bacilos, luego de establecida la infección. Sin embargo, a partir de la re-evaluación de los aspectos relacionados con la protección mediada por los Acs frente a la infección por *M. tuberculosis* y la búsqueda de nuevas alternativas, en los últimos años, se han publicado numerosos reportes que evidencian el papel de los Acs en la protección contra este patógeno. Estas evidencias han demostrado que frente a la infección por *M. tuberculosis*, se produce tanto respuesta inmune celular como humoral, reforzando entre ambos tipos de respuesta los mecanismos de defensa del sistema inmune del hospedero.

Las investigaciones encaminadas a demostrar el papel de los Acs en este sentido, han estado motivadas por los resultados obtenidos a partir del empleo de la seroterapia frente a enfermedades causadas por patógenos intracelulares, hongos, virus y bacterias no micobacterianas. La utilización de la seroterapia contra la TB en sus inicios mostró resultados contradictorios entre los diferentes grupos de investigación, desde la presencia de un mayor número de UFC en los bazo de ratones deficientes de Acs, con respecto a los controles no deficitarios de Acs (Cavalcane y cols, 1997), hasta la no protección (Hussain y cols, 2001). Sin embargo, en la actualidad existen evidencias más claras del rol que juegan los Acs frente a la TB, basados en las funciones que pueden desempeñar estas moléculas dirigidas a la opsonización, neutralización, lisis mediada por complemento y protección a nivel de mucosa, función de extrema importancia en la TB teniendo en cuenta que la principal puerta de entrada de su agente causal es el sistema respiratorio. Los ejemplos son numerosos, pero sólo por citar algunos que justifiquen lo

anteriormente expuesto, nombraremos los siguientes. Lee y colaboradores, en 1997, dieron a conocer resultados que muestran que ante la infección causada por la bacteria intracelular obligada *Ehrlichia chaffensis*, los Acs específicos pueden mediar la protección, mediante el bloqueo de la entrada a las células o promoviendo la expresión de citoquinas proinflamatorias (Lee y Rikihisa, 1997). Por otra parte, la vacuna de subunidades de polisacáridos de *Salmonella typhi* está basada en la protección mediada por Acs (Edebo y cols, 1985). Así mismo, se ha demostrado la protección mediada por Acs frente a la infección por *Toxoplasma gondii* (Mineo y cols, 1994). Un ejemplo interesante lo constituye la protección, mediante AcM, frente a la infección por *Cryptococcus neoformans* (Dromer y cols, 1985). *C. neoformans* y *M. tuberculosis* son ambos organismos intracelulares con superficies ricas en polisacáridos, que provocan reacción tisular granulomatosa. Ambos penetran al hospedero fundamentalmente mediante la inhalación y tienen la capacidad de diseminarse extracelularmente y entrar al estado de latencia, conociéndose que la respuesta protectora frente a estos está asociada a citoquinas con un patrón Th1 (Dromer y cols, 1985).

Uno de los hallazgos experimentales más importantes fue reportado por Armstrong, el cual sugirió el efecto de los Acs incrementando la fusión fago-lisosomal durante la fagocitosis de la micobacteria (Armstrong y Hart, 1975). Ivanyi y colaboradores reportaron resultados experimentales sobre la cinética de distribución de AcM contra la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis*, administrados por diferentes vías a ratones Balb/c y su efecto protector de corta duración en modelos murinos frente a la infección por *M. tuberculosis* (Reljic y cols, 2006b).

El modelo murino ha contribuido en gran medida al avance en los conocimientos del papel de los Acs en la protección contra las infecciones micobacterianas. Así, al infectar ratones

deficientes de células B mediante aerosol con 100 UFC de *M. tuberculosis*, se demostró que los mismos desarrollan una inmunopatología exacerbada relacionado con un elevado reclutamiento de neutrófilos a nivel pulmonar (Maglione y cols, 2007). Estos ratones, además, mostraron un incremento en la producción de IL-10 en pulmón, mientras que los niveles de IFN- γ y TNF- α , permanecieron inalterados. Guirardo y colaboradores, estudiaron el rol del suero contra la reactivación de la infección por *M. tuberculosis* en ratones SCID y obtuvieron que la inmunización pasiva con un suero obtenido de ratones tratados con extracto de *M. tuberculosis* detoxificado (*liberado en liposomas, RUTI*), induce un nivel de protección significativo (Guirardo y cols, 2006).

Además de los ejemplos anteriores, un estudio previo sugirió que la producción de Acs puede verse favorecida por la colaboración de células restringidas a CD1. Esto es basado en el hecho de que las CD pueden capturar Ags que son procesados y presentados a células NKT o células Th, según sean presentados Ags lipídicos o proteicos (Brigl y Brenner, 2004). De igual forma, las células B capturan Ags que son procesados y presentados a estos tipos celulares, los cuales, bajo la acción de ambos tipos de APC, son estimulados a producir citoquinas que actúan directamente sobre los linfocitos B para producir Acs (Lang y Glatman-Freedman, 2006).

Recientemente se ha estudiado a profundidad el papel de los receptores Fc- γ en la protección frente a los patógenos intracelulares (Nimmerjahn y Ravetch, 2006). Estos receptores se clasifican en estimuladores e inhibidores según la presencia de motivos ITIM e ITAM (Nimmerjahn y Ravetch, 2006). Así, se ha observado que los receptores de tipo inhibitorios como el Fc γ -RIIB, actúan directamente sobre linfocitos T limitando la maduración de las CD y por tanto la presentación antigénica, eventos que se ven promovidos por los receptores de tipo estimulatorios (Dhodapkar y cols, 2005). Además,

estos receptores inhibitorios estimulan la tolerancia periférica de células T en modelos murinos de autoinmunidad y se ha visto que el bloqueo de estos receptores aumenta la actividad de células T en modelos experimentales tumorales (Dhodapkar y cols, 2005).

II.6 Calostro humano: Fuente importante de protección inmunológica

El calostro y la leche materna son fuentes ricas en Acs. Estas secreciones garantizan la transferencia de inmunidad pasiva de la madre al recién nacido. El contenido de Igs en calostro y leche es altamente dependiente de la especie animal (Butler y Kehrlí, 2005) y se ha demostrado que el perfil de Igs en el calostro humano es similar al encontrado en la leche, donde los niveles de IgA son mayoritarios en ambas secreciones (*88-90% del total de Ig*) (Butler, 1974).

La lactancia materna ha sido tradicionalmente una forma de alimentación óptima para los humanos por cientos de años, constituyendo una fuente importante de factores como la protección inmunológica de los infantes y el desarrollo neurológico. Bennett y Jasper evaluaron la cantidad de leucocitos en las secreciones de las glándulas mamarias y sugirieron que la presencia de las células mononucleares durante la formación del calostro, está relacionada con el papel de la inmunidad celular en la protección inmunitaria del neonato, a través del calostro (Bennett y Jasper, 1977). Por otro lado, el trabajo de Schlesinger y Covelli sugirió la transferencia de función e información activa inmunitaria en la leche y el calostro humano. Esto fue basado en el hecho de que los neonatos de madres con resultados positivos en la prueba de derivado proteico purificado de tuberculina tenían linfocitos circulantes reactivos a la tuberculina en los ensayos *in vitro*, mientras que los neonatos de madres no reactivas no los tenían (Schlesinger y Covelli, 1977). La leche materna es especie-específica y la composición de la leche humana es efectiva en la promoción del crecimiento, desarrollo cerebral y producción de enzimas que

favorecen la digestión. El elevado contenido en proteínas y bajo en grasas del calostro brinda al infante exactamente lo necesario para el desarrollo, en el nuevo ambiente, durante los primeros días posteriores al nacimiento (Aquilina y Winkelman, 2008). Las propiedades anti-infectivas de la leche materna proveen defensas contra diferentes enfermedades. La lactoferrina es una proteína que compite con las bacterias en la unión al hierro, promueve lactobacilos y es esencial para la proliferación de células B y T (Lawrence y Lawrence, 1999). Por su parte, los carbohidratos presentes en la leche materna estimulan *Lactobacillus bifidus*, el cual inhibe la adherencia de los patógenos al epitelio intestinal (Walker, 2002). Además, se ha evidenciado que las infecciones respiratorias, especialmente virus sincitial y otitis media, tienen menos incidencia en los lactantes que consumen leche materna (Riordan y Auerbach, 1998).

Las propiedades inmunológicas ofrecidas por la leche materna confieren al infante protección contra diversos patógenos como *E. coli*, *Shigella* y *Haemophilus influenzae*. El consumo de leche materna disminuye la probabilidad de ocurrencia de diarreas en los infantes, debido a que las Igs presentes en la misma protegen al intestino de la colonización de estos patógenos (Riordan y Auerbach, 1998). Además, tanto las propiedades anti-inflamatorias como anti-alérgicas, previenen las reacciones provocadas por alergias alimenticias, protegiendo adicionalmente contra enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus tipo 1, el cáncer, la leucemia y la enfermedad de Crohn (Dann, 2007).

- II.6.1 Purificación de IgA a partir de calostro humano

La literatura recoge diferentes métodos mediante los cuales puede purificarse la IgA a partir de calostro. Estos agrupan de manera general cromatografía de afinidad y fraccionamiento convencional (Current Protocols in Immunology, 2001). La cromatografía de afinidad puede ser desarrollada empleando matriz de proteína de unión a IgA (Current

Protocols in Immunology, 2001) o matriz de lectina Jacalina (McGuire y cols, 1989). Sin embargo, el uso de la matriz de proteína de unión a IgA tiene como desventaja la elevada viscosidad de la solución tampón empleada para eluir, lo cual se traduce en baja velocidad del flujo y adicionalmente, conlleva a la necesidad de dializar el eluato antes de realizar otros análisis. La matriz de lectina jacalina por su parte tiene la desventaja de que solo une el isotipo 1 de la IgA.

Dentro de las técnicas empleadas en el fraccionamiento convencional, puede ser empleado inicialmente fraccionamiento inicial con sulfato de amonio (Romero-Piffiquer y Riera, 1979), pero este método no discrimina entre isotipos y tiende a la alta formación de agregados por lo que es más recomendado la centrifugación seriada seguida de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular en gel filtración (Goil y cols, 1998). Esta combinación de métodos permite eliminar caseínas y lípidos del calostro, los cuales constituyen componentes mayoritarios en esta secreción y cuya presencia puede afectar la pureza en la purificación de la IgA. Adicionalmente, la cromatografía de intercambio iónico permite separar la IgA en base a su punto isoeléctrico, y la cromatografía de exclusión molecular, en base a su tamaño molecular, en ambos casos para la IgAs, diferente al del resto de los componentes del calostro.

II.7 Algunos elementos del Sistema Inmune Mucosal

A nivel de las mucosas existe un contacto íntimo entre el organismo y el medio ambiente. La mayoría de los agentes infecciosos llegan al cuerpo a través de las mucosas, y el moco adherido a la superficie constituye una barrera esencial del sistema inmune mucosal. La superficie mucosal del cuerpo humano incluye las mucosas de la cavidad oral, las vías respiratorias y los tractos genitourinario y gastrointestinal. Las superficies mucosales son altamente vulnerables a la penetración, colonización e invasión de

microorganismos particularmente patógenos. Cuando penetra un agente nocivo, se desencadena una reacción a nivel de las mucosas, donde la adherencia bacteriana constituye un paso clave en el desarrollo del proceso patológico y en la permanencia del agente infeccioso en el hospedero, a través del acceso a los nutrientes.

Las proteínas de la superficie bacteriana, llamadas adhesinas, se unen a los compuestos glicoconjugados presentes en la célula huésped y actúan como receptores específicos. La adherencia permite la multiplicación bacteriana y a través de ella, la bacteria encuentra la vía para acceder a los órganos y tejidos, facilitando la síntesis y entrada a las células de toxinas bacterianas, su transporte y la correcta presentación antigénica, como paso inicial ante el establecimiento de una respuesta inmune a ese nivel.

La infección de las mucosas por patógenos intracelulares induce una respuesta inmune mediada por células (van Ginkel y cols, 2000), constituida fundamentalmente por células T tipo 1 ($CD4^+$ y $CD8^+$) y linfocitos citotóxicos. Esta respuesta se acompaña normalmente de la producción de IgAs, la cual provee una primera línea de defensa muy importante contra la invasión de agentes patógenos hacia los tejidos.

En el organismo, la IgAs constituye más del 80% de todos los Acs producidos por el MALT. Además, la IgAs no sólo está presente en las secreciones externas, sino también ejerce propiedades antimicrobianas en las células epiteliales durante su transporte a través del epitelio. Representa a su vez, la clase de Ig predominante en las secreciones externas, con una cantidad bien definida y brinda una protección inmunológica específica para todas las superficies mucosales, al producir un bloqueo a este nivel ante la penetración de agentes patógenos al organismo (Corthesy y Spertin, 1999).

II.7.1 Inmunidad mucosal respiratoria

La superficie de las vías respiratorias contienen muchas sustancias que pueden tener

propiedades anti-micobacterianas incluyendo lisozimas y defensinas (Bermúdez y cols, 1980; Ogata y cols, 1992; Miyakawa y cols, 1996). El epitelio provee de una barrera física y produce una gran variedad de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo TNF- α (Simon y Paine, 1995). Adicionalmente, los MA son otra importante línea de defensa del hospedero en el pulmón y son las primeras células diana ante la infección por *M. tuberculosis*. Las moléculas CD14 de la superficie de los macrófagos no tienen efecto en la captura de *M. tuberculosis*, sin embargo, los TLR juegan un rol en la fagocitosis así como en la muerte de la micobacteria mediante mecanismos dependientes e independientes de ON, tanto por los MA humanos como murinos, respectivamente (Thoma-Uszynski y cols, 2001). El receptor de manosa de los macrófagos puede, incluso, facilitar la fagocitosis de *M. tuberculosis* y además, es capaz de producir cantidades significativas de citoquinas tipo 1 incluyendo IL-12, IFN- γ y TNF- α (Wang *et al.*, 1999). Las citoquinas producidas por los MA, tales como IL-12 e IFN- γ , pueden ayudar en la producción de metabolitos reactivos tales como el ON, el cual tiene propiedades micobactericidas (Xing y cols, 2000).

Las CD se encuentran ampliamente distribuidas a través de todo el epitelio de las vías respiratorias (Holt y cols, 1989) y las mismas pueden ser encontradas en la superficie alveolar y en el parénquima pulmonar (Stumbles y cols, 2003). Estas son las más potentes APC y pueden expresar elevados niveles de moléculas co-estimuladoras, tales como MHC clase I y clase II (Mellman y Steinman, 2001).

II.8 Inmunoglobulina A

La clase A de las Igs fue descubierta por Gugler y von Muralt, a partir de observaciones de que no todas las proteínas mielomas eran clasificadas como clase 7S (*bajo contenido en carbohidratos*) y 16S (*alto contenido en carbohidratos*). De esa forma, se caracterizó una

Ig distinta, con un elevado contenido en carbohidratos, a la cual denominaron γ A (y después IgA), la cual se conoce que migra en la región β -globulina luego de electroforesis (Gugler y von Muralt, 1959). Posteriormente se demostró que este isotipo es abundante en las secreciones exocrinas (Chodiker y Tomasi, 1963). Más de 8 modelos fueron propuestos a finales de los 60 y principios de los 70, para explicar cómo la IgA podía llegar a las secreciones.

Años más tarde se demostró que la IgA es la Ig más abundante sintetizada en humanos, si se compara con el resto de las Igs, con una producción de aproximadamente 66 mg/kg de peso corporal diariamente (Zaldivar, 2002). La IgA puede existir en tres formas monoméricas (IgA1, IgA2m1 e IgA2m2), una forma dimérica (IgA1d) y la IgAs (Chintalacharuvu y cols, 2002). La diferencia más significativa entre los dos isotipos de IgAm radica en la presencia de una región de 13 residuos de aminoácidos adicionales que posee el isotipo IgA1, conteniendo carbohidratos unidos a los grupos oxígeno en esta región (Chintalacharuvu y cols, 2002). En el suero humano la presencia de IgA 1 es mayoritaria con respecto a la IgA 2 (90% y 10%, *respectivamente*) y es capaz de establecer interacciones bivalentes con moléculas antigénicas. Esta característica, en cuanto a distribución, refleja el hecho de que las células plasmáticas de la médula ósea son fuente de IgA sérica, mientras que las células plasmáticas de la lámina media son fuente de IgAs (Sabillón y Abdu, 1997). La presencia de múltiples sitios de unión en la IgAp provee un incremento en la avidéz por los Ags. Adicionalmente, la IgAs posee una extensión de 18 residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal (*tail-piece*), el cual participa en la polimerización del penúltimo residuo Cis y, los motivos estructurales en los dominios de la región constante son imprescindibles para el ensamblaje de polímeros y la incorporación de la cadena J (*del inglés joining*) (Yoo y cols, 1999).

Se ha planteado que la efectividad de la IgA depende de su integridad estructural y muchas bacterias que causan enfermedad por colonización o infección de las membranas mucosales en el ser humano, secretan proteasas de IgA 1. Estas enzimas clivan entre los residuos Pro y Ser o entre los residuos Pro y Thr en la molécula de IgA1 (Yoo y cols, 1999).

II.8.1 Estructura

En humanos, se presentan dos genes de regiones constantes pesadas ($C\alpha$), dando lugar a dos subclases de IgA, IgA1 e IgA2. Al igual que otras Igs, la IgA consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (**Fig.3**). En la IgA dimérica, dos unidades de monómero forman una configuración estabilizada por puentes disulfuro y la incorporación de la cadena J, un polipéptido de 15 kDa. La polimerización es regulada por la incorporación de la cadena J debido a que su presencia estimula la polimerización (Johansen y cols, 2001) y es dirigida por el dominio carboxilo terminal de la cadena pesada (Braathen y cols, 2002). La cadena J es sintetizada junto con la IgA en las células plasmáticas y su incorporación es un evento temprano en la polimerización de la IgA. En consecuencia, este péptido es encontrado en todas las formas poliméricas de la IgA (Sørensen y cols, 2000). La polimerización de dos o más moléculas de IgA con la cadena J ocurre tarde en la vía secretora, justo antes de la liberación desde las células plasmáticas hacia el espacio luminal (McCune y cols, 1981).

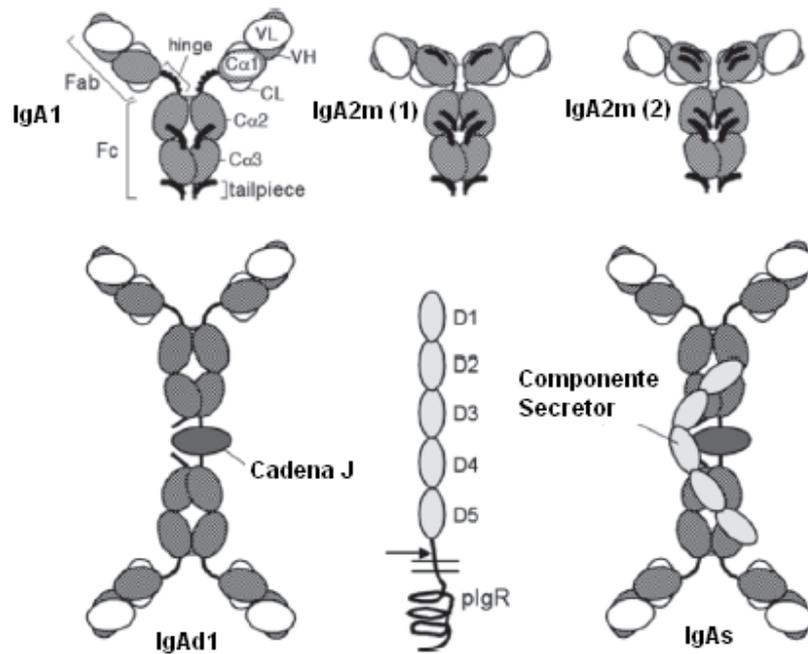


FIGURA 3. Representación esquemática de formas monoméricas de IgA humana (IgA1, IgA2m1 e IgA2m2), IgA dimérica e IgA secretora, además del plgR. La IgA secretora contiene el CS con 7 sitios de N-glicosilación y la cadena J con un sitio N-glicano. El CS se encuentra covalentemente unido a un extremo del dominio Ca2 y el otro extremo interactúa no covalentemente con la cadena J y con uno de los dominios Ca3 de la cadena H. El CS a través de sus residuos CH, asegura la localización in vivo de la IgA apropiada por anclaje al recubrimiento de mucus en la superficie del epitelio. Adaptado de Woof y Kerr, 2006.

Por otra parte, la región Fc es crítica para la función efectora de la IgA, mediante la interacción con varios receptores de la superficie celular (**ANEXO 1**). La unión de la IgA a complejos inmunes tales como receptores sirve esencialmente para el reconocimiento de patógenos vía región Fab de la molécula de Ac a través de mecanismos capaces de promover la eliminación de estos agentes patógenos. Los receptores de unión a la región Fc de la IgA incluyen FcαR1, presentes en células fagocíticas tales como neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, FcαμR en células B y plgR en células epiteliales (Herr y cols, 2003). La IgA polimeriza fundamentalmente en dímeros, lo cual le brinda estabilidad a su estructura mediante las interacciones covalentes con la cadena J, polipéptido que también se encuentra presente en la IgM pentamérica (Koshland, 1985).

El CS, como parte integral de la molécula de IgA₂ liberada en las secreciones, estabiliza la IgA haciéndola más resistente a la acción de las proteasas (Crottet y Corthesy, 1998) y mediante sus residuos glicosilados, incrementa la capacidad protectora de la IgA a través de su anclaje dentro de la mucosa (Phalipon y cols, 2002).

II.8.2 Funciones biológicas

La IgA juega un rol importante en la protección de las superficies mucosales. Los receptores específicos para la región Fc de la IgA, FcαR, son mediadores clave de las funciones efectoras de esta Ig, proporcionando un vínculo entre el complejo Ag-Ac y la maquinaria efectora celular. Sin embargo, estos receptores además funcionan como una segunda línea de defensa antibacteriana utilizando más la IgA que la IgA monomérica presente en suero (Monteiro y van de Winkel, 2003). El receptor FcαR humano, llamado FcαR1 o CD89, fue el primero en ser clonado y caracterizado y es considerado el mejor candidato para la iniciación de la respuesta inflamatoria involucrando la IgA (Otten y van Egmond, 2004).

La variedad de mecanismos efectores dirigidos por la unión del complejo inmune formado por la IgA y el FcαR, incluye ADCC, fagocitosis por las células del linaje mieloide (*monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos*), actividad respiratoria explosiva por leucocitos polimorfo-nucleares y degranulación de eosinófilos y basófilos (Monteiro y van de Winkel, 2003). Además, la unión al FcαR facilita la presentación de Ags en CD humanas (Geissmann y cols, 2001). Por el contrario, datos tempranos sugieren la función no inflamatoria de la IgA. Esto es acentuado por el hecho de que la IgA es pobre activador del complemento, aunque, en ciertas condiciones, puede estimular la vía alterna del complemento (Kerr, 1990).

En contraste con la IgA sérica, la IgAs es incapaz de estimular la fagocitosis por neutrófilos *in vitro* o por las células Kupffer *in vivo*, lo cual es posiblemente debido, en parte, al bloqueo del sitio de unión al Fc α R1 (Herr y cols, 2003). Esto puede constituir un elemento importante para el mantenimiento de la integridad en las superficies mucosales. Además, la activación del complemento induce reacciones inflamatorias locales, incluyendo el influjo de leucocitos polimorfo-nucleares y la liberación de sustancias como citoquinas, que incrementan la permeabilidad de las membranas mucosales.

La IgAs contribuye a la protección de la barrera epitelio-mucosal a través de una variedad de mecanismos. El primer mecanismo de protección por IgAs es activo en el lado estromal del epitelio, donde la IgA puede formar complejos con los Ags. Este inmunocomplejo puede ser tomado por las células fagocíticas, absorbido en el sistema vascular o transportado a través del epitelio hacia el lumen, utilizando la vía mediada por pIgR (Robinson y cols, 2001). De esta forma, los Ags que pasan a través de la barrera epitelial pueden ser aclarados de vuelta al lumen y ser transportados en forma de inmunocomplejo con la IgA. Esta función de eliminación inmune de la IgA, permite mantener los tejidos mucosales libres de inmunocomplejos excesivos. Aún más, durante el transporte mediado por pIgR, la IgAp específica puede unirse a proteínas virales sintetizadas nuevamente dentro de las células epiteliales, previniendo el ensamblaje del virión y neutralizando la replicación viral (Bomsel y cols, 1998). Usando un modelo *in vitro* de células intestinales polarizadas, se demostró que la IgA protege, a través de un mecanismo anti-inflamatorio, contra componentes bacterianos intracelulares, involucrados en la activación de las células epiteliales intestinales (Fernández y cols, 2003). El principal mecanismo de la IgAs está basado en su capacidad de interactuar con Ags en el lado luminal luego de la transcitosis epitelial. De ese modo, puede interferir con la habilidad de los Ags (*incluyendo virus, bacterias, toxinas y enzimas bacterianas*), de

adherirse y penetrar en la mucosa, mediante el fenómeno de exclusión inmune (Brandtzaeg, 2003a).

Se plantea que en el contexto de la infección inmune, existen dos funciones protectoras primarias atribuidas a las Igs secretoras, incluyendo la IgA. Estas funciones son la inhibición del contacto entre el patógeno o toxinas ligandos y la superficie de las células epiteliales mucosales (*referido como exclusión inmune*) y la neutralización de la replicación viral, o actividad de toxinas, en las células epiteliales (*conocido como neutralización intracelular*) (Strugnell y Wijburg, 2010) (Fig.4).

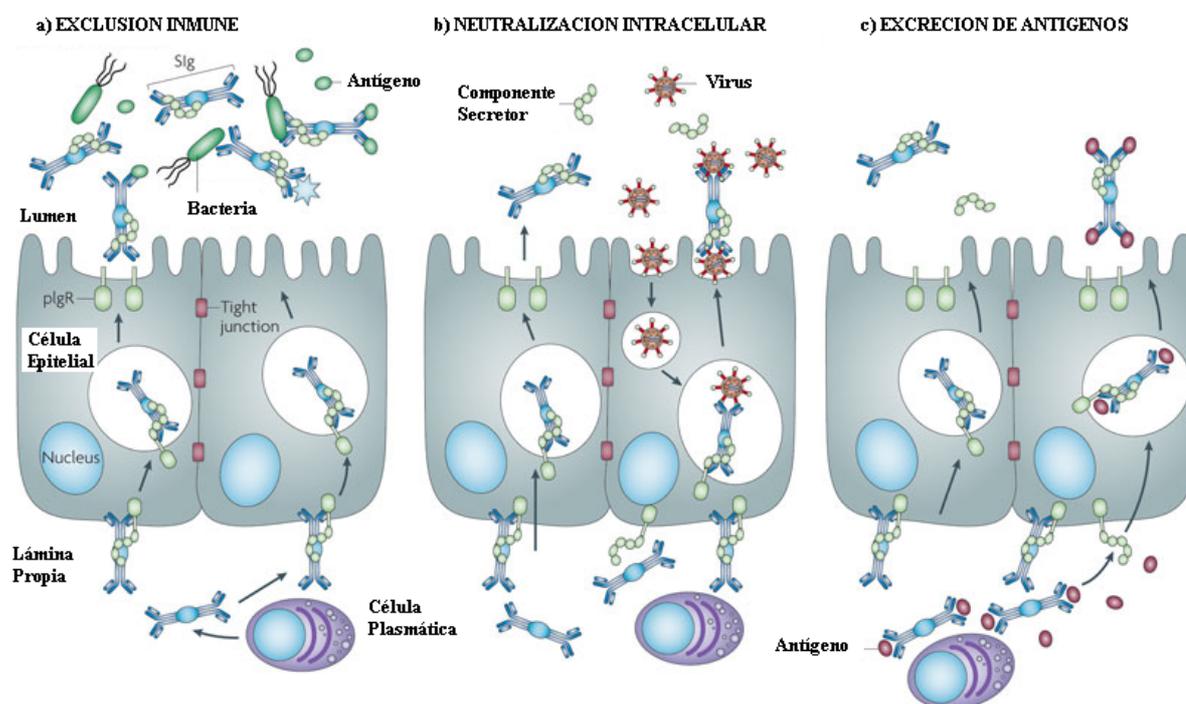


FIGURA 4. Mecanismos de protección mediante IgAs en las superficies mucosales.

a) IgAs une antígenos patogénicos y previene o inhibe su adherencia y/o invasión a las células epiteliales.

b) El complejo de receptor de Inmunoglobulina polimérico (pIgR) a la IgA mediante la cadena J media la neutralización intracelular de los patógenos que invaden las células epiteliales.

c) Además, la excreción de antígenos mediante la secreción de inmunoglobulinas mantiene la homeostasis en las superficies mucosales.

La IgAs media el aclaramiento de antígenos de la lámina propia mucosal, en la cual los antígenos están unidos a la IgA dimérica y son subsecuentemente transportados a la superficie luminal de las

células epiteliales, seguido de endocitosis del complejo IgA-pIgR-Ag y su posterior liberación en el lumen mucosal. Tomado de Strugnell y Wijburg, 2010

Debido a la naturaleza polimérica de la IgAs, esta posee una mayor avidéz que la IgA monomérica y por ello, puede unirse a macromoléculas y microorganismos, inhibiendo su motilidad y facilitando el atrapamiento en la mucosa y el aclaramiento por peristalsis (Renegar y cols, 1997). Además, la IgAs es una molécula cargada negativamente, hidrofílica, debido a la predominancia de aminoácidos hidrofílicos en la región Fc y abundante glicosilación tanto de la molécula de Ac como del CS (Kerr, 1990). En consecuencia, los microorganismos rodeados por la IgAs son repelidos por la superficie mucosal.

II.8.3 Regulación a nivel mucosal

La mayor parte de la IgAp producida es translocada al lumen intestinal en el adulto cada día a través de su unión con el pIgR (≈ 40 mg/kg de peso corporal) y se ha estimado que aproximadamente 3 g de IgAs son diariamente exportados hacia este espacio (Conley y Delacroix, 1987). La mucosa intestinal es el órgano efector más importante cuantitativamente de la inmunidad mediada por Acs. Aunque la expresión de pIgR/CS en membrana es regulada constitutivamente, esta puede ser incrementada a nivel transcripcional por citoquinas inmunoregulatoras (*IFN- γ* e *IL-4*), así como por citoquinas pro-inflamatorias (*TNF* e *IL-1*) (Brandtzaeg y cols, 1992; Norderhaug y cols, 1999). La expresión de ambos es dependiente de una adecuada presencia de vitamina A (*ácido retinoico*) y del estado nutricional de la persona (Ha y Woodward, 1998).

II.8.4 Papel de la Inmunoglobulina A en la Tuberculosis. Avances.

El hecho de que la IgA sea la Ig más abundante a nivel mucosal, ha motivado el interés de

muchos investigadores encaminado a evaluar sus posibles roles frente a la infección por diversos microorganismos que penetren al hospedero a través de esta vía.

Existen hasta el momento, algunos estudios donde se ha evaluado el papel de la IgA, en forma de AcM, frente a la infección por *M. tuberculosis*. Por ejemplo, Balu y colaboradores mostraron recientemente que la inoculación intranasal de un AcM IgA (2E91IgA1) e IFN- γ de ratón recombinante, inhibe significativamente la infección pulmonar por *M. tuberculosis* H37Rv en ratones transgénicos para CD89. Este efecto no fue observado en los controles negativos, lo cual sugiere que la unión a CD89 es necesaria para la protección pasiva conferida por la IgA (Balu y cols, 2011). Adicionalmente, el tratamiento con IFN- γ 3 días antes de la infección y con AcM IgA contra acr, 2 hrs antes y 2 y 7 días después de la infección por aerosol con *M. tuberculosis* H37Rv, disminuyó la infección en pulmón a las 4 semanas, mostrando un efecto mayor que cuando se administró la IgA o el IFN- γ , por sí solos (Reljic y cols, 2006b). Por otro lado, la aplicación intranasal de AcM IgA contra acr1, mostró efecto protector contra la infección pulmonar temprana por *M. tuberculosis* en ratón (Williams y cols, 2004). 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 (Rodríguez y cols, 2005).

Un experimento previo reveló que la IgA se une a la lectina intracelular Gal-3 (Mac-2), la cual ha sido previamente demostrado que une IgE y otros ligandos de Igs (Liu y cols, 2002). Aunque Gal-3 no está directamente involucrado en la fagocitosis, se conoce que su interacción con la IgA puede jugar un rol importante en la inhibición intracelular de *M. tuberculosis* mediado por este Ac (Reljic y cols, 2006a) (**Fig.5**). Así, Gal-3 ha sido previamente mostrado que se acumula, fundamentalmente en los fagosomas, los cuales

contienen a *M. tuberculosis* vivo mediante la unión a los PIM, y al parecer influye en el aclaramiento de la infección (Beatty y cols, 2002).

Además, el Gal-3 secretado, con sus bien descritas propiedades quimio-atrayentes de monocitos (Sano y cols, 2000), juega un rol importante en la acumulación de monocitos *in vivo*, en sitios de tejido que albergan la bacteria opsonizada por la IgA, conduciendo a su aclaramiento por fagocitosis. La expresión de Gal-3 por monocitos y macrófagos es dependiente de la diferenciación celular y puede ser inducida por IFN- γ (Sato y Hughes, 1994) lo cual puede explicar en cierto modo, el potencial de esta citoquina para estimular el efecto bactericida de la IgA contra los macrófagos infectados por *M. tuberculosis*.

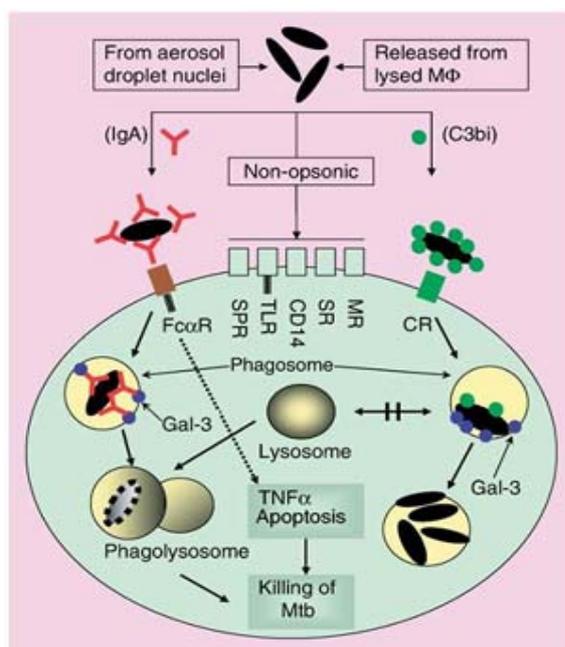


FIGURA 5. Ilustración esquemática de mecanismos hipotéticos mediante los cuales el AcM de IgA anti *acr* puede restringir la multiplicación de *M. tuberculosis* en los macrófagos. El bacilo opsonizado por C3bi en los macrófagos alveolares no induce señales pro-inflamatorias y fusión fago-lisosomal durante la infección natural. Tomado de Reljic y cols, 2006a.

Una posible explicación para la interacción IgA/Gal-3 y su papel en la infección por *M. tuberculosis*, es que la micobacteria opsonizada por la IgA puede identificar el complejo Gal-3/FcγRII en la superficie de los macrófagos. Gal-3 además interactúa específicamente con el receptor de baja afinidad para IgG FcγRII/CD32 (Liu y cols, 1995). Se plantea que son necesarios trabajos adicionales para entender los mecanismos moleculares involucrados en la inhibición, mediada por la IgA, de la infección pulmonar causada por *M. tuberculosis*, aunque estos autores proponen que el mecanismo clave involucra la potenciación de las funciones bactericidas de la IgA sobre los macrófagos infectados. Esto puede, a su vez, implicar la apoptosis dependiente de activación, conduciendo a la muerte del bacilo, o la inhibición mediada por la interacción IgA/Gal-3, con la membrana fagosomal, la cual es requerida para la inhibición de la fusión fago-lisosomal (Cortegano y cols, 2000).

II.9 Vacunas contra la Tuberculosis

II.9.1 Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)

Por más de 80 años, ninguna nueva vacuna ha sido exitosamente desarrollada contra la TB. La vacuna BCG, actualmente usada contra esta enfermedad, es derivada de una cepa viva atenuada de *M. bovis*. BCG posee las ventajas de ser una vacuna barata, que ha sido aplicada a más de 3 billones de personas en el mundo, confiere protección a largo plazo en la mayoría de los vacunados. BCG además tiene propiedades adyuvantes intrínsecas, no es inactivada por los Acs maternos, es termoestable y puede ser administrada por vía mucosal, todo lo cual contribuye a la inducción de una respuesta inmune tanto humoral como celular (Martin, 2005). A pesar de esto, se conoce que BCG protege sólo contra las formas severas de la enfermedad durante la infancia, siendo

incapaz de proteger contra la TB pulmonar en la edad adulta, fundamentalmente en países en los cuales la TB es una enfermedad endémica.

Las posibles causas de la variable eficacia del BCG (0-80%) han sido discutidas extensamente, y continúan siendo objeto de investigación activa. Los factores causales de este fenómeno son múltiples y han generado mucho debate y diversidad de líneas de trabajo encaminadas a la obtención de una vacuna más eficaz contra la TB. Estos factores incluyen el amplio espectro de virulencia que existe entre las cepas de *M. tuberculosis*, la pérdida progresiva de la capacidad de BCG para estimular una respuesta inmune protectora y el nivel de exposición a micobacterias ambientales (Turner y cols, 2000). Adicionalmente, la diversidad genética entre las diferentes cepas de BCG, la inmunogenicidad inherentemente débil y el debilitamiento de la memoria inmunológica, son considerados otros factores determinantes de la variable eficacia del BCG (Douglas y cols, 2008).

Por otra parte, hay genes importantes ausentes en todas las cepas de BCG, como la delección de 16 fragmentos de marcos abiertos de lectura, que incluyen la codificación de las proteínas ESAT-6 y MTSA-10, que se expresan juntas en la superficie de *M. tuberculosis* (Julian y cols, 2004).

II.9.2 Nuevas vacunas en estudio contra la TB. Mejoramiento de la vacuna BCG

La sustitución actual de la vacuna BCG por una nueva vacuna contra la TB que sea más segura, particularmente en niños infectados con el VIH, y que ofrezca una protección mejor y más duradera, es la meta principal de la comunidad científica que investiga nuevas vacunas contra esta enfermedad. Una estrategia complementaria consiste en

utilizar una vacuna potenciadora de subunidades para la protección contra la TB en niños, adolescentes y adultos jóvenes, de manera que actúe en sintonía con las nuevas vacunas vivas atenuadas aplicadas al nacer, para inducir una respuesta inmune más específica y potente (McShane y Hill, 2005). Se espera que el empleo de esta estrategia novedosa, genere una vacuna más efectiva para proteger contra la enfermedad pulmonar (McShane y Hill, 2005).

Los proyectos relacionados con la investigación y el desarrollo de vacunas contra la TB en la actualidad tienden a ser multicéntricos y emplean modelos de reto con *M. tuberculosis* como criterio de protección (Hernández-Pando y cols, 2010). El uso de experimentos de reto para determinar la capacidad protectora de los candidatos vacunales tiene una complejidad intrínseca debido al lento crecimiento de la micobacteria, la duración de los experimentos (*usualmente entre 6 y 9 meses*) y los requerimientos de bioseguridad nivel 3 (Hernández-Pando y cols, 2010). Debido a la compleja naturaleza de los ensayos de reto, la necesidad de elevada especialización y las costosas facilidades necesarias para tales estudios, la mayoría de estos experimentos son normalmente desarrollados en centros de referencia internacional donde los candidatos vacunales se desarrollan entre diferentes grupos de investigación, quienes brindan seguimiento a los protocolos experimentales y los criterios de evaluación (Hernández-Pando y cols, 2010).

La vacunación específica diseñada para prevenir la TB latente o la reactivación del estado latente al infeccioso, se encuentran en fases tempranas de desarrollo. Para la erradicación de la TB, es necesaria la obtención de una nueva vacuna que confiera una protección mejor que el BCG. En los últimos 10 años de trabajo con modelos animales de experimentación, se han obtenido algunos candidatos vacunales que se encuentran en la actualidad en diferentes fases de investigación (de Valliere y cols, 2005).

Se considera que las vacunas que pudieran ser utilizadas antes y después de la exposición a *M. tuberculosis*, para proteger contra la infección inicial, la latencia y la reactivación, podrían ser de gran valor en el control de la TB (Lewellys y cols, 2009).

Dos estrategias que están siendo evaluadas para reemplazar al BCG actual son, la obtención de un BCGr y la atenuación de cepas de *M. tuberculosis*, ambas destinadas a lograr una mejor estimulación del sistema inmune. La primera vacuna BCGr administrada a humanos en estudios clínicos, que sobre-expresó el Ag85B de *M. tuberculosis*, potenció una respuesta inmune de linfocitos T CD4⁺ específica para este Ag y demostró una eficacia sustancialmente mayor en un modelo animal que su cepa BCG parental (Hoft y cols, 2008). Otra vacuna BCGr evaluada en humanos expresa listeriolisina, una molécula perforadora de membrana producida por *Listeria monocytogenes*, para mejorar la presentación antigénica cruzada, y como resultado ofrecer mejor protección. Este candidato genera una respuesta inmune de células T CD8⁺ más fuerte y específica, presumiblemente porque promueve la liberación de Ags microbianos al citoplasma a través de la membrana endosómica perforada, mejorando de este modo la presentación de Ags por moléculas MHC clase I e induciendo la apoptosis de macrófagos infectados (Grode y cols, 2005). Otra cepa de BCGr expresa una perfringolisina mutada con un modo de acción similar a la listeriolisina (Skeiky y Sadoff, 2006). Este candidato ha mostrado ser más seguro que el BCG en ratones con inmunodeficiencia combinada severa. Las vacunas de células completas atenuadas de *M. tuberculosis* también fueron consideradas y muchas están en estudios preclínicos (Sambandamurthy y cols, 2006; Derrick y cols, 2007; Cardona y cols, 2009). En relación al uso de patógenos vivos en niños y el potencial de *M. tuberculosis* atenuado para revertir la virulencia, requiere que estas vacunas sean sometidas a pruebas rigurosas de seguridad. Hasta la fecha, las vacunas de *M.*

tuberculosis atenuado han mostrado resultados prometedores en modelos de reto animal para TB incluyendo primates no humanos (Verreck y cols, 2009).

II.10 Modelos animales de experimentación en el desarrollo de una nueva vacuna contra la TB

El uso de modelos animales para estudiar las diversas enfermedades ha sido extremadamente importante en el desarrollo de la medicina científica. Muchas de las observaciones cruciales en la etiopatogénesis de diferentes enfermedades *in vivo*, incluyendo las enfermedades infecciosas, han sido posibles a partir del uso de los modelos animales de experimentación. Los modelos animales han sido esenciales en la evaluación de nuevas drogas y su toxicidad, así como en la evaluación de la eficacia de nuevas vacunas, representando uno de los ensayos preclínicos más importantes (Orme y cols, 2001).

M. tuberculosis infecta y causa enfermedad en una amplia variedad de especies mamíferas, pero los modelos que más se han empleado son el ratón y el curiel, cada uno de ellos con sus respectivas ventajas y desventajas. La vacuna BCG actualmente empleada confiere protección en ratones y curieles en términos de reducción de la carga bacteriana en 1:2 y 2:4 órdenes de magnitud, respectivamente (Orme y cols, 2001). Diferentes modelos animales han sido explorados para ser incluidos en los modelos de TB latente con el objetivo de evaluar vacunas terapéuticas y de post-exposición, así como modelos que consideran las influencias inmuno-moduladoras de las micobacterias ambientales (Lowrie y cols, 1999; McKinney, 2000).

Una gran variedad de modelos animales diferentes han sido empleados para estudiar la inmunopatología inducida por *M. tuberculosis* en el pulmón, incluyendo ratón, conejo, curiel, ratas, vacas, peces y monos. Basado en el conocimiento de la inmunopatogénesis,

estos modelos animales han sido también usados en el diseño y evaluación de varios regímenes inmunoterapéuticos, así como en la evaluación de las herramientas para evaluar la eficiencia de nuevas drogas y vacunas.

La patología de la TB varía considerablemente entre ratones y humanos (Orme y cols, 2001). A pesar de esto, las investigaciones acerca del desarrollo de la TB en ratones continúa siendo un objetivo atractivo dentro de la investigación experimental, debido a los conocimientos que se tienen acerca del sistema inmune murino y de la disponibilidad de varias cepas de ratones *knock-out*. Los curieles son más susceptibles a la TB que los humanos y la patología que se desencadena como consecuencia de las lesiones necróticas es muy similar a la desarrollada en humano. De forma similar, tanto los curieles como los humanos, expresan moléculas CD1 y células T específicas para glicolípidos CD1 (Dascher y cols, 1999). Experimentos preliminares indican que los glicolípidos pueden inducir una protección parcial contra la TB en curieles. Las moléculas CD1 del grupo 1 están ausentes en ratón. En estas especies, las células T participan en la respuesta frente a la TB, pero no se ha observado una respuesta específica a fosfolípidos. Como las células T específicas a fosfolípidos también están ausentes en curieles, los análisis experimentales de este tipo de respuesta inmune *in vivo*, están restringidos a primates no humanos. Los primates no humanos son susceptibles naturalmente a la infección con *M. tuberculosis* y tienen tanto células T específicas a fosfolípidos como células T específicas a glicolípidos CD1, pero sólo un limitado número de experimentos en este biomodelo han sido realizados hasta la actualidad (Walsh y cols, 1996; McMurray, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Consideraciones Éticas y Bioéticas

Todos los procesos experimentales se realizaron bajo anestesia, según la Guía para el cuidado y empleo de los animales de laboratorio de la Comunidad Económica Europea (EEC Council Directive, 1987) (*Estudio de Distribución de la IgAsh*) y según las normas establecidas en el reglamento del Comité de Ética Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Subirán”, México D.F. (*Ensayo de Reto*). Los animales se mantuvieron en condiciones adecuadas de distribución (5 animales/caja) y alimentación y se controlaron diariamente los factores físicos, químicos y ambientales (temperatura (21-24°C), humedad (20-25%), ciclo alternativo de luz / oscuridad de 12 hrs).

III.2 Obtención de calostro humano

Las muestras de calostro fueron gentilmente donadas por el Servicio de Neonatología de los hospitales ginecobstétricos de Ciudad de la Habana (“*América Arias*”, “*Enrique Cabrera*” y “*González Coro*”). El calostro se obtuvo de mujeres sanas entre los 2 y 4 días posteriores al parto. El mismo se recolectó de manera manual y se mezcló y almacenó en frascos de vidrio estériles a -20°C hasta su procesamiento.

III.3 Purificación de IgAsh a partir de calostro e identificación

Previo a los procesos de purificación de la IgA a partir del calostro humano, 50 mL de este se centrifugaron a 330 000 x g durante 1 hr, con el objetivo de separar los lípidos y el debris celular. Se obtuvieron tres fases: una fase superior, que contenía la fracción lipídica, una capa intermedia con la fase acuosa y el precipitado, consistente en los elementos celulares del calostro. El suero se obtuvo acidulando la fase acuosa intermedia con NaCl 1 mol/L, pH6.4 (Sigma, USA) y luego, sometido a centrifugación a 13 000 x g

durante 20 mins. El suero obtenido se clarificó por filtración (*filtros Sartorius de 0.2 μ de porosidad*) y se almacenó a -20°C en alícuotas de 1 mL. Para purificar la IgAsh, se llevó a cabo una estrategia de purificación combinada, donde se empleó cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular mediante filtración en gel, basado en el método descrito por Goil y cols, 1998.

III.3.1 Cromatografía de Intercambio Aniónico

Se aplicaron 25 mL de calostro humano delipidado y descaseinado en una columna de flujo rápido DEAE-Sepharose (16x10) (Amershan, Suecia), estabilizada previamente con solución Na_3PO_4 10 mM, pH7.6 (Merck, Alemania) y lavada con 4 volúmenes de columna. La fracción específica se eluyó con solución Na_3PO_4 100 mM, pH6.4 (Merck, Alemania). Para regenerar la columna se empleó NaCl 1M. La cromatografía se desarrolló con un flujo volumétrico de 4 mL/min. El rango de absorbancia empleado fue 0.5.

III.3.2 Cromatografía de Exclusión Molecular

Como segundo paso en la purificación, se desarrolló una cromatografía de exclusión molecular en gel filtración. Para ello se empleó una columna cromatográfica XK con dimensiones 1.6x100 cm, empacada con Superose 6 grado preparativo (Amersham Biotech, Suecia), previamente equilibrada con solución Na_3PO_4 100 mM, pH 6.4 (Merck, Alemania). Se determinó la eficiencia de la columna, arrojando un valor de $N=33\ 000$ platos teóricos/metro. Adicionalmente se calibró la columna empleando el kit de calibración de alto peso molecular para gel filtración compuesto por: apoferritina (443 000 dalton), aldolasa (150 000 dalton), albúmina sérica bovina (66 000 dalton) y anhidrasa carbónica (29 000 dalton) [MW-GF-100029,000-700,000], Sigma, USA.

Se aplicaron 10 mL de la muestra obtenida en la segunda fracción de la cromatografía de intercambio aniónico, representando aproximadamente el 0.5% del volumen total de la

columna. La cromatografía se desarrolló empleando un flujo volumétrico de 1 mL/min, empleando un detector Uvicord SII 280 nm (Pharmacia, Suecia) y registrada en un Rec-102 recorder (Pharmacia, Suecia). El rango de absorbancia utilizado fue 0.2.

III.3.3 Identificación de la presencia de IgAsh

- III.3.3.1 Dot blot

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular, se evaluaron mediante dot blot, con el objetivo de identificar la presencia de la IgA en las mismas. Se aplicaron 15 µL (15 µg/mL) de la IgAsh purificada en papel de nitrocelulosa bajo vacío. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 3% de leche descremada (Oxoid, USA) en SSTF, durante 30 mins a 37°C y lavada tres veces con SSTF. La membrana se incubó con anti IgAh conjugada a peroxidasa, (Sigma, USA) (1/2000) en SSTF-T (0.1%), conteniendo 1.5% de leche descremada (Oxoid, USA), durante 1 hr en agitación a 37°C. Se lavó con SSTF-T de tres a cuatro veces durante 5 mins y después una vez con SSTF. Finalmente, la muestra fue visualizada empleando DAB (Sigma, USA), (20 mg DAB en 40 mL de SSTF y 40 mL de H₂O₂ Merck, Alemania). La reacción fue detenida con agua destilada.

- III.3.3.2 SDS-PAGE

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular fueron además analizadas mediante SDS-PAGE, en un gel al 12.5%, según metodología descrita por (Laemmli, 1970). Se calentaron 15 µg de IgAsh y 1/20 de calostro humano a 100°C durante 5 mins, en buffer muestra reductor. La corrida electroforética se desarrolló a 30 mA y 150 V en una cámara Modelo EPS 500/400 (Pharmacia, Suecia). Luego de la corrida, el gel se tiñó con R250 Azul Coomassie (Sigma, USA) de acuerdo a Tsai y Frasch,

1982. Se empleó como marcador un patrón de bajo peso molecular con un rango entre 14 y 97 kDa (Pharmacia, Suecia). Las bandas se visualizaron y analizaron en un digitalizador de imágenes (ImageMaster, Pharmacia Biotech, Suecia).

III.3.4 Determinación de la presencia de IgG en la muestra de IgAsh purificada.

Teniendo en cuenta que la IgG es la segunda Ig en elevado contenido en el calostro humano, evaluamos su posible presencia en la IgAsh mediante dot blot. Para ello se empleó como control negativo SSTF (15 µL) y se aplicó IgAsh (15 µL a partir de 15 µg) e Intacglobin (15 µg). Las muestras se aplicaron en dos tiras de nitrocelulosa, las cuales se bloquearon con 3% de leche descremada (Oxoid, USA) en SSTF durante 30 mins a 37°C y se lavaron tres veces con SSTF. Una de las tiras se incubó con anti-IgAh conjugado a peroxidasa (Sigma, USA) (1/2000) y la otra, con anti-IgGh conjugado a peroxidasa (Sigma, USA) (1/1000), ambas en SSTF-T, conteniendo 1.5% de leche descremada (Oxoid, USA), durante 1 hr en agitación a 37°C. Se lavó con SSTF-T de tres a cuatro veces durante 5 mins y después una vez con SSTF. Finalmente, las muestras fueron visualizadas empleando DAB (Sigma, USA), (20 mg DAB en 40 mL de SSTF y 40 mL de H₂O₂). La reacción fue detenida con agua destilada.

III.4 Estudio del reconocimiento de IgAsh frente a antígenos de *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*.

Para estudiar el posible reconocimiento de la IgAsh purificada, se evaluó su reactividad frente a Ags de micobacterias, empleando un lisado de células completas de *M. bovis* BCG (*BCG Vaccine Sofia, Bulgaria*), un lisado de células de *M. tuberculosis* (*donado por el Dr. Patrick J. Brennan, Colorado State University, USA*) y un lisado de células enteras de *M. smegmatis* MC2 155 (*perteneciente a la colección de cepas del Instituto de*

Medicina Tropical “Pedro Kouri”), mediante western blot y ELISA.

III.4.1 Western blot

Previo a la realización del western blot, se determinó la concentración óptima del lisado de *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*, mediante electroforesis en SDS-PAGE 12.5% (*datos no mostrados*), escogiéndose finalmente 200 µg del lisado de células completas de *M. bovis* BCG y 80 µg del lisado de células de *M. tuberculosis*.

Ambos lisados se centrifugaron a 720 x g durante 5 mins y se mezclaron con 10 µL de buffer reductor y se sometieron a calentamiento durante 10 mins a 100°C. Se aplicaron 5 µL de cada preparación en un gel SDS-PAGE al 12.5%, empleándose como marcador un patrón de bajo peso molecular con un rango entre 14 y 97 kDa (Pharmacia, Suecia).

Las muestras se aplicaron dos veces alternando entre *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*. Los Ags micobacterianos separados se transfirieron según la metodología descrita (Burnette, 1980), en papel de nitrocelulosa con tamaño de poro 0.45 µm, empleando un sistema de transferencia húmedo (*Dry Transfer Cell, Bio-Rad, USA*), durante 1 hr a 20 V. La membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras, de manera que cada una contenía un carril con Ags de *M. bovis* y otro con Ags de *M. tuberculosis*. Cada tira se bloqueó con leche descremada (Oxoid, USA) al 3% en SSTF, por 30 mins a 37°C. Luego de lavar tres veces con SSTF-T, se incubó una tira con calostro humano (1/20) y la otra con IgAsh purificada (15 µg), durante toda la noche a 4°C. Se lavó tres veces con SSTF-T y se incubó con anti-IgAh conjugado a peroxidasa (*Sigma, USA*) (1/2000), durante 1 hr a 37°C. Se lavó tres veces con SSTF-T y luego, dos veces con SSTF. Las membranas se revelaron con DAB (*Sigma, USA*) (20 mg DAB en 40 mL de SSTF y 40 mL de H₂O₂ Merck, Alemania). Finalmente, la reacción se detuvo con agua destilada.

III.4.2 ELISA

Placas de poliestireno (*Maxisorp, Nunc*), se recubrieron con lisado de células enteras de *M. bovis* BCG (10^6 bacterias/mL) y *M. smegmatis* (10^6 bacterias/mL), (100 μ L/pozo). Las placas fueron incubadas durante 16 hrs a 37°C. Se lavaron las placas con SSTF y se bloquearon con leche descremada (*Oxoid, USA*) al 3% en SSTF-T. Se evaluó la reactividad de la IgAsh en diluciones doble seriadas desde 10 μ g/mL. Cada muestra se aplicó por duplicado (50 μ L/pozo) e incubada durante 1 hr a 37°C. Luego de tres lavados con SSTF-T, las muestras se incubaron con anti-IgAh conjugado a peroxidasa (*Sigma, USA*), empleando una dilución 1/1000 (50 μ L/pozo), durante 1 hr a 37°C. La reacción se desarrolló con una solución de OPD (*Sigma, USA*) (4 mg de OPD en 10 mL de solución tampón citrato 0.1 M, pH5 y 5 μ L de H₂O₂ Merck, Alemania). La reacción se detuvo con 50 μ L de H₂SO₄ (*Merck, Alemania*) (2N) luego de 20 mins y la absorbancia se determinó a 492 nm en un lector de ELISA (*Multiscan, Multisoft*). Los resultados se representan con los valores de DO de la dilución de cada muestra.

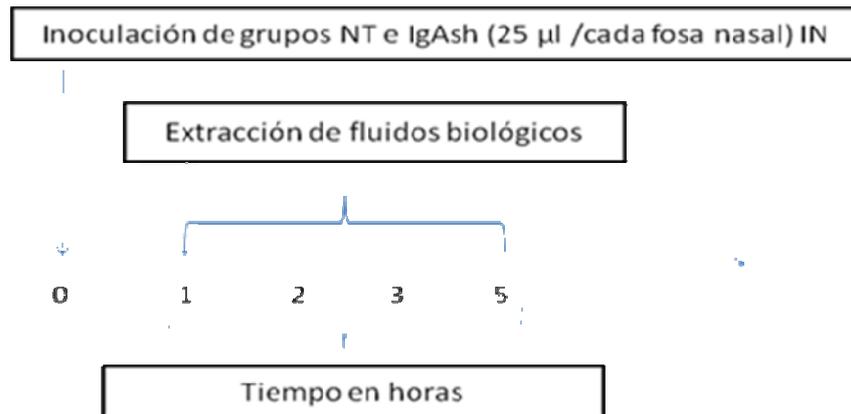
III.5 Estudio de la cinética de distribución de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c, luego de su administración por vía intranasal.

III.5.1 Inoculación de IgAsh a ratones Balb/c por vía intranasal

Para este estudio se emplearon ratones machos de la línea isogénica Balb/c (*procedentes de CENPALAB*), de entre 8 y 10 semanas de edad y con un peso entre 16 y 18 gr, distribuidos en dos grupos de 20 ratones cada uno (*Grupo NT y Grupo IgAsh*). Los ratones del grupo NT se inocularon con 50 μ L SSTF por vía intranasal (25 μ L en cada fosa nasal) y los del grupo IgAsh, con 50 μ L de IgAsh purificada (1 mg/mL), por vía intranasal (25 μ L en cada fosa nasal), empleando para ambos casos una micropipeta.

III.5.2 Extracción de muestras biológicas a diferentes tiempos posteriores a la inoculación

Se extrajeron las muestras de suero, saliva y lavado tráqueo-bronquial, tomando 5 animales diferentes de cada grupo, 1, 2, 3 y 5 hrs posteriores a la inoculación, en aras de determinar la presencia de la IgAsh mediante ELISA, como se explica en el esquema 1.



ESQUEMA 1. Esquema empleado para cinética de biodistribución de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c.

El suero se obtuvo a partir de la sangre recolectada por punción del seno retro-orbital, utilizando un capilar de 1 mm de diámetro. Las muestras de saliva se obtuvieron luego de la inoculación de 50 µL de una solución de pilocarpina 1% (IMEFA, La Habana, Cuba), por vía intraperitoneal. Entre los 2 y 5 mins posteriores, se recolectó la saliva directamente del animal en un microtubo eppendorf. Las muestras de saliva se incubaron durante 15 mins a 56°C y luego se centrifugaron a 13 000 x g, colectándose el sobrenadante para evaluar la presencia de la IgAsh. Previa recolección del lavado tráqueo-bronquial, se practicó eutanasia a los animales mediante dislocación cervical. A cada ratón se le practicó una incisión anterior en el cuello y se expuso la tráquea, la cual se permeabilizó en su porción antero-posterior. Se inoculó 1 mL de solución salina al 0.87% y finalmente se extrajo todo el fluido tráqueo-bronquial.

III.5.3 Determinación de la presencia de IgAsh en fluidos biológicos de ratón Balb/c

La presencia de la IgAsh en fluidos biológicos de ratón se determinó mediante ELISA, siguiendo la metodología descrita por Olivares y cols, 2006. Placas de poliestireno (*Maxisorp, Nunc*), se recubrieron con anti-IgAh, obtenido de suero de conejos inmunizados con IgAsh purificada de calostro (*Dirección de Biotecnología, Instituto Finlay*), a una dilución 1/1000 en solución de recubrimiento (100 µL/pozo). Las placas se incubaron durante 16 hrs a 4°C. Se lavaron las placas con SSTF y se bloquearon con leche descremada (*Oxoid, USA*) al 3% en SSTF-T. Las muestras de suero se evaluaron en una dilución 1/50 en SSTF, las muestras de saliva se diluyeron 1/2 en SSTF y el lavado tráqueo-bronquial se aplicó puro. Como control negativo se emplearon las muestras obtenidas del grupo NT, utilizando las mismas diluciones. Como control positivo, se utilizó la IgAsh purificada de calostro humano. Cada muestra se aplicó por duplicado (50 µL/pozo) y se incubó durante 1 hr a 37°C. Luego de tres lavados con SSTF-T, las muestras se incubaron con anti-IgAh conjugado a peroxidasa (*Sigma, USA*), empleando una dilución 1/1000 (50 µL/pozo), durante 1 hr 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 µL de H₂O₂ Merck, Alemania). La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ (2N) (Merck, Alemania) luego de 20 mins y la absorbancia fue determinada a 492 nm en un lector de ELISA (*Multiscan, Multisoft*). Los resultados se representan con los valores de DO de la dilución de cada muestra.

III.6 Evaluación de la capacidad protectora de la administración de IgAsh por vía intranasal, en un modelo murino de infección intratraqueal con *M. tuberculosis*.

III.6.1 Cepa de *M. tuberculosis*

Se empleó un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) en fase logarítmica,

obtenido en medio Middlebrook 7H9 (Difco, USA), suplementado con albúmina-dextrosa-catalasa (*BBL, Cockeysville, MD*) y Tween 80 al 0,05% (Sigma, USA), incubado a 37°C en una atmósfera continua con 5% de CO₂. Las bacterias se separaron por centrifugación (5000 x g) y se lavaron y almacenaron a -70° C en alícuotas que contenían 10⁶ bacterias/mL hasta su uso.

III.6.2 Inóculo bacteriano

El inóculo se ajustó a una concentración de 10⁶ bacterias/mL. El conteo se realizó en una cámara de Newbauer, empleándose diacetato de fluoresceína (Sigma, USA) y un microscopio de fluorescencia [Nys y cols, 1999].

III.6.3 Animales

Se utilizaron 60 ratones machos de la línea isogénica Balb/c, de entre 6 y 8 semanas de edad, procedentes del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”, México D.F, divididos en 3 grupos de 20 ratones cada uno.

III.6.4 Preincubación de *M. tuberculosis* con IgAsh.

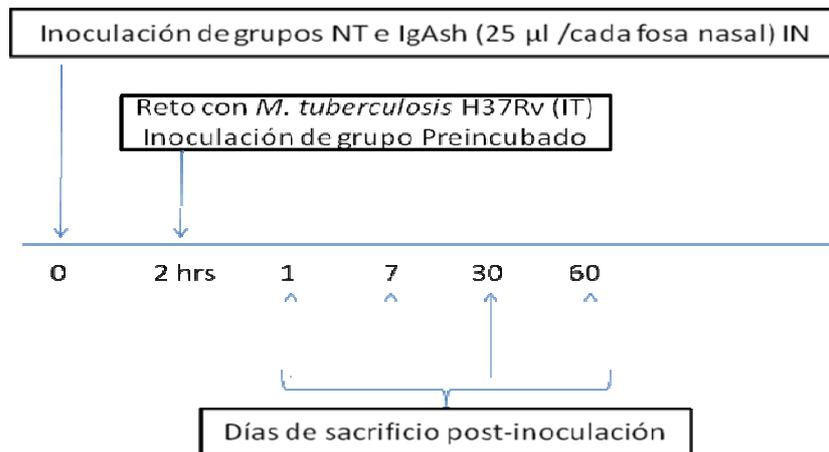
Se incubó *M. tuberculosis* 10⁶ UFC x animal (a razón de 1 mg de IgAsh x 10⁶ UFC), en 1 mL de SSTF estéril y se mantuvo en agitación suave a temperatura ambiente, durante 4 hrs. Se lavó dos veces con SSTF estéril y se ajustó a la concentración requerida para la inoculación (10⁶ bacterias/mL), en SSTF estéril.

III.6.5 Inoculación de IgAsh por vía intranasal y posterior infección con *M. tuberculosis* por vía intratraqueal e inoculación de *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh

Grupos:

- ❖ *No tratado (NT)*: Animales inoculados con solución salina por vía intranasal e infectados con 100 µL conteniendo 10⁶ UFC de *M. tuberculosis* por vía intratraqueal.
- ❖ *Inmunoglobulina A secretora humana (IgAsh)*: Animales inoculados con 1 mg de la IgAsh por vía intranasal (25 µL en cada fosa nasal) y retados 2 hrs después con 100 µL conteniendo 10⁶ UFC de *M. tuberculosis*, por vía intratraqueal.
- ❖ *Preincubado (Preinc)*: Animales retados por vía intratraqueal con 100 µL conteniendo 10⁶ UFC de *M. tuberculosis*, previamente incubado con 1mg de IgAsh.

El diagrama del experimento de reto es mostrado en detalle en el esquema 2.



ESQUEMA 2. Esquema utilizado en el ensayo de reto para la evaluación de la capacidad protectora de la IgAsh frente a la infección pulmonar con *M. tuberculosis*.

Los ratones se anestesiaron en cajas cerradas conteniendo vapores de Seborane (ABBOTT, México) y se inmovilizaron sobre placas de disección con cinta adhesiva. La inoculación por vía intratraqueal se realizó mediante el empleo de cánulas estériles, con 100 µL conteniendo 10⁶ UFC de *M. tuberculosis* o de *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh, según el grupo, y se colocó el ratón en posición vertical durante 10 mins. Los ratones se colocaron en cajas conectadas a micro-aisladores con presión negativa, donde se mantuvieron durante todo el experimento. Todos los procesos se realizaron en una

instalación con nivel de bioseguridad III.

Cinco ratones de cada grupo se sacrificaron en los días 1, 7, 30 y 60 después de la infección con *M. tuberculosis*. Estos animales se anestesiaron con éter (Merck, Alemania) y se desangraron por el plexo axilar de la extremidad anterior derecha. De cada ratón, se tomó 1 pulmón alternando entre izquierdo y derecho. El pulmón se pinzó y se extrajo, colocándose inmediatamente en un criotubo que se almacenó en nitrógeno líquido para su conservación. Los criotubos se mantuvieron a -70°C para el análisis de las UFC (Hirsch y cols, 1999).

Para el análisis histopatológico, se tomaron tres pulmones, de cada grupo en cada intervalo de tiempo, y se perfundieron con 1 mL de etanol (Merck, Alemania) a través de la tráquea. Las piezas extraídas se colocaron en tubos Falcon conteniendo 5 mL de etanol absoluto (Merck, Alemania).

Para el estudio de citoquinas, se pinzaron y se extrajeron 3 pulmones y se colocaron en un criotubo conteniendo medio RPMI (Sigma, USA), e inmediatamente se almacenaron en nitrógeno líquido. Estas muestras se mantuvieron a -70° C.

III.6.6 Determinación de la carga bacteriana en el pulmón de ratones Balb/c

Para determinar la eficiencia en el tratamiento con la IgAsh, se determinó la carga bacteriana mediante el conteo de UFC de *M. tuberculosis* en el homogenizado de pulmón. Para ello, se descongelaron los pulmones mantenidos a -70°C (3 pulmones por cada grupo) y se homogenizaron empleando un Politron (*Brinkmann Instrument, Rexleid, Canadá*), en 1 mL de SS isotónica estéril con 0,05% de Tween 80 (Sigma, USA). Una vez obtenido el homogenizado, se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), en SSTF-

T. Tanto el macerado concentrado como cada una de las diluciones preparadas se sembraron por duplicado en placas Petri conteniendo medio Agar Middlebrook 7H10 (Difco, USA). Las placas se incubaron a 37°C. Las placas se mantuvieron durante 21 días, y luego de este tiempo, se contó el número de UFC en un microscopio estereoscopio. El número de UFC contadas se multiplicó por el factor de dilución para obtener el número total de UFC en el pulmón (Glatman-Freedman y cols, 1998). La carga bacteriana se expresó como el logaritmo del número de bacterias presentes en cada pulmón.

III.6.7 Estudio histopatológico y morfométrico en pulmón de ratones Balb/c

- III.6.7.1 Procesamiento histopatológico: Inclusión en parafina

Los pulmones que se mantuvieron en etanol absoluto (Merck, Alemania), se cortaron para-sagitalmente y se colocaron dentro de casetes de inclusión, con la cara interna de ambas mitades hacia abajo. Los casetes se introdujeron en alcohol absoluto (Merck, Alemania), y posteriormente, en dos alcoholes más, cada uno durante 1 hr, con el objetivo de deshidratar los tejidos al máximo. Luego, los casetes se transfirieron a xilol (Sigma, USA) y dos xiloles más, durante 1 hr cada uno, con el objetivo de eliminar los posibles restos de agua presente en los tejidos. Por último, los casetes se colocaron en tres frascos de parafina (Sigma, USA) derretida y mantenida a 60°C, en cada una durante 1 hr. Una vez concluido el proceso de fijación de los tejidos, los pulmones se montaron en bloques de parafina (Lugton, 1999), de manera que los tejidos estuvieran listos para los cortes histológicos.

Las secciones de tejido pulmonar se cortaron con un grosor de 3 µm y se colocaron en láminas portaobjetos, las cuales se desparafinaron a 60°C durante 30 mins. Los cortes se hicieron por duplicado, de manera que una de las láminas de cada corte se tiñó con

Hematoxilina y Eosina, para facilitar el estudio histopatológico y la otra, con Ziehl-Neelsen, para confirmar la presencia e identidad de la micobacteria.

- III.6.7.2 Análisis morfométrico

Las áreas afectadas por el proceso infeccioso se determinaron empleando un analizador de imágenes acoplado al microscopio ZIDAS (*Zeiss Interactive Digital System*). El área total de neumonías se calculó como la sumatoria del área ocupada por todas las zonas de neumonía observadas en cada corte del pulmón. El porcentaje del área neumónica se obtuvo determinando el área total del pulmón y comparándola con el área del tejido neumónico (*consolidado*), en ambos casos, sin considerar el área de espacios muertos presentes en el corte, ocupado por los vasos principales y bronquios pulmonares.

III.6.8. Determinación de la expresión, en pulmón, de los genes IFN- γ , TNF- α , iNOS e IL-4, en ratones Balb/c

- III.6.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real se aplicó para la determinación del ARNm de IFN- γ , TNF- α , iNOS e IL-4, en el tejido pulmonar de los ratones retados con *M. tuberculosis* (Hernández-Pando, 1997). El ARN se aisló empleando el mini-Kit RNAsa (Qiagen, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad de ARN se midió mediante electroforesis en gel de agarosa. La transcripción reversa de los ARNm se realizó empleando 12 μ L de ARN, oligo dt y el kit Omniscript (Qiagen, USA). El PCR en tiempo real se realizó mediante el sistema 7500 (Applied Biosystems, USA) y Quantitect SYBR Green Master Mix Kit (Qiagen, USA) (Flynn y Joel, 2000) y se incluyeron curvas estándares de los productos en cada corrida de PCR. Los primers específicos se diseñaron usando el programa Primer Express (Applied Biosystem, USA)

GEN CONSTITUTIVO

G3PDH	sentido 5'-AGCGAGGAGCAGGTGGAAG-3' antisentido 5'- CATTTCGCTGTCTCCCCAA-3'
TNF-α	sentido 5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3' antisentido 5'- GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3'
IFN-γ	sentido 5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3' antisentido 5'- CTCAAACCTGGCAATACTCATGA-3'
iNOS	sentido 5'-CATTTCGCTGCTCCCCAA-3' antisentido 5'- AGCGAGGAGCAGGTGGAAG-3'
IL-4	sentido 5'-AGAAGACTCTGTGCACCGAGTTGA-3' antisentido 5'- TCATGATCGTCTTTAGCCTTT-3'

Las **condiciones de la reacción** fueron:

Desnaturalización inicial a 95°C por 15 mins, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 s, 60°C por 20 s y 72°C por 34 s. La cantidad de ARNm en la muestra se midió de acuerdo al gen estándar específico. El número de copias de ARNm de cada citoquina se relacionó con 1 millón de copias de ARNm del gen G3DPH.

III.6.9 Determinación de la expresión de citoquinas en subpoblaciones linfocitarias de interés en pulmón de ratones Balb/c.

- III.6.9.1 Citometría de flujo

Para estudiar la presencia de células positivas a diferentes citoquinas de importancia relevante durante la infección por *M. tuberculosis*, se tomaron tres pulmones de cada grupo, en cada uno de los tiempos evaluados después de la infección. Los pulmones se colocaron en 1 mL de medio RPMI (medio 1640) (Sigma, USA) y se les adicionó 4 μ L de colagenasa Tipo 2 (0,5 mg/mL) (Sigma, USA), incubándose durante 1 hr a 37°C. El tejido

se pasó a través de un tamiz de 70 μm , éste se maceró empleando el émbolo de una jeringuilla y repitiendo el proceso hasta que no se observaran restos de tejido y se obtuviera una solución homogénea en 1 mL de medio RPMI (medio 1640) (Sigma, USA). El macerado se incubó durante 10 mins a 4°C y se centrifugó a 15 000 x g durante 10 mins a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación y los restos de glóbulos rojos se lisaron con solución tamponada de lisis. Se centrifugó nuevamente a 15 000 x g durante 10 mins a 4°C y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio RPMI (medio 1640) (Sigma, USA). Se adicionaron 250 000 células por pocillo de cada macerado de pulmón y se emplearon diferentes marcadores celulares (*CD4*, *CD8*, *CD11* y *CD11 combinado con CD86*) todos procedentes de BD Pharmingen, durante 20 mins a 4°C. Cada botón celular se lavó dos veces con SSTF/albúmina y se incubó la placa con 150 μL de saponina (Sigma, USA), durante 20 mins a 4°C. Se lavó la placa con SSTF/albúmina, se adicionaron los marcadores intracelulares y se incubó durante 20 mins a 4°C (*IFN- γ para CD4*, *IFN- γ para CD8*, *TNF- α para CD11* e *IL12 para CD11/CD86*). Se lavó con SSTF/albúmina y se resuspendieron los botones celulares en 100 μL de SSTF. Las muestras se analizaron empleando un citómetro *Guava Easycyte Mini*.

III.7 Procesamiento estadístico

Para todos los análisis estadísticos realizados, se utilizó el paquete de programas GraphPad Prism v4.00 (GraphPad Software Inc. 2003). La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Barlet. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante el análisis de comparaciones múltiples, prueba de Tukey, previa comprobación de diferencias entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación doble. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para valores de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer trabajo que demostró la existencia de la IgA, como la principal inmunoglobulina de la leche materna humana, fue reportado hace poco más de medio siglo (Hanson, 1959). A partir de ese momento, la IgA ha sido purificada empleando diferentes métodos basados en precipitación con sulfato de amonio (Romero-Piffguer y Riera, 1979), cromatografía de intercambio aniónico (Balint y cols, 1982), cromatografía de afinidad en una matriz de jacalina-Sepharosa (Loomes y cols, 1991) y extracción con polietilenglicol (Beetham y cols, 1993), por sólo citar algunos. Sin embargo, la matriz de jacalina, por ejemplo, a pesar de ser uno de los métodos más eficientes, sólo precipita la subclase 1 de la IgAs (Dobos y cols, 1995). Teniendo en cuenta que nuestro objetivo consistía en obtener la IgAs total, empleamos una estrategia de purificación combinada utilizando cromatografía de intercambio iónico, seguida de cromatografía de exclusión molecular en gel filtración, en aras de obtener ambas subclases de IgAs y con el mayor nivel de pureza posible, basado en la metodología descrita por Goil y cols, 1998..

IV.1 Purificación de IgAsh a partir de calostro humano e identificación

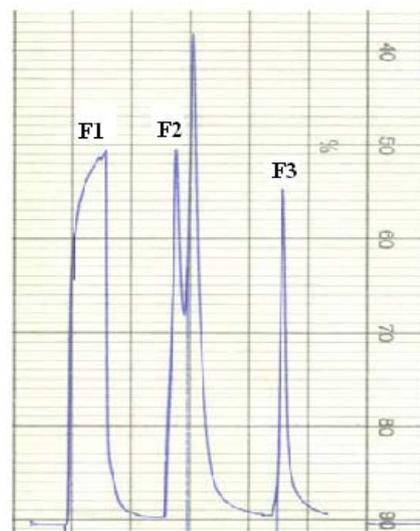
IV.1.1 Cromatografía de Intercambio Iónico

El primer paso dentro de la purificación de la IgAs de calostro humano se empleó cromatografía de intercambio aniónico. Como resultado se obtuvieron tres fracciones. Una primera fracción eluída con fosfato de sodio 10 mM, pH 7.6, donde la IgAs está cargada negativamente y se encuentra fijada fácilmente a la matriz (**Fig.6, F1**). La segunda fracción, obtenida en forma de pico bimodal (**Fig.6, F2**) se eluyó con fosfato de sodio 100 mM, pH 6.4. Consideramos probable la presencia de la IgAsh en esta fracción, teniendo en cuenta que su punto isoeléctrico es 6.5 (Elkon, 1984), muy similar al pH de la solución

tampón empleada para eluir la misma. Además, se obtuvo una fracción tercera y final, que pudiera corresponder a otros componentes del calostro (*lactosa, lactoferrina, timosina-α*) (Fig.6, F3).

FIGURA 6. Perfil cromatográfico de la purificación de la IgA a partir de calostro humano por cromatografía de intercambio aniónico en matriz de DEAE-Sepharosa.

F1, fracción eluida con fosfato de sodio 10 mmol/L, pH7,6
F2, fracción eluida con fosfato de sodio 100 mmol/L, pH6,4
F3, fracción eluida con NaCl 1 mol/L.



IV.1.2 Cromatografía de Exclusión Molecular

Con el objetivo de eliminar posibles restos de otros componentes del calostro que no estaban dentro del rango molecular de la IgAsh pero que pudieron haber eluido junto con esta en la etapa inicial de purificación, la fracción 2 obtenida en el pico bimodal de la cromatografía de intercambio aniónico se aplicó en una cromatografía de exclusión molecular en gel filtración, utilizando una columna empacada con Superosa 6 (Fig.7). Para la purificación de la IgAsh mediante exclusión molecular se seleccionó una matriz de Superosa 6 grado preparativo, teniendo en cuenta que posee un rango de exclusión molecular entre 5000 y 5×10^6 Da y la IgAsh posee un tamaño molecular de 390 kDa (Bach, 1982).

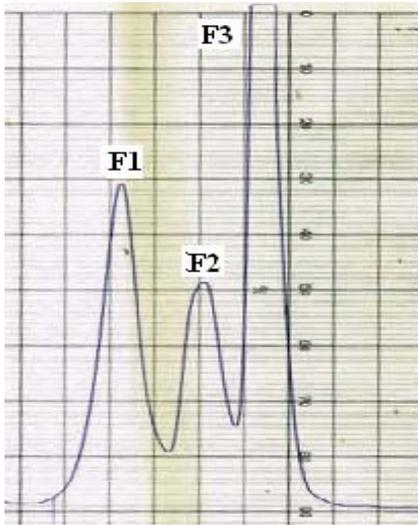


FIGURA 7. Perfil cromatográfico de la purificación de IgAsh por cromatografía de gel filtración en matriz de Superose 6. Se aplicaron 500 μ L (10 mg), del pico bimodal obtenido en cromatografía de intercambio aniónico, representando aproximadamente el 0.5 % del volumen total de la columna.

F1, F2 y F3, fracciones eluidas con fosfato de sodio 100 mmol/L, pH6.4.

En este caso, se eluyeron tres fracciones consistentemente. Teniendo en cuenta el tamaño molecular de la IgAsh, consideramos que la misma debe estar incluida en la fracción 1, eluida con fosfato de sodio 100 mM, pH 6.4 (**Fig.7, F1**).

IV.1.3 Identificación de la presencia de IgAsh

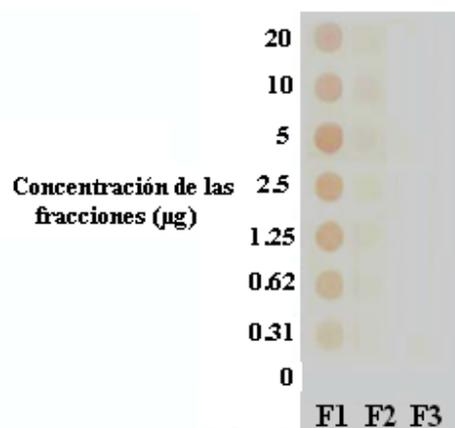
IV.1.3.1 Dot blot

Para identificar la presencia de la IgAsh en las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular, se aplicaron las mismas en una membrana de nitrocelulosa y fueron evaluadas mediante dot blot.

Al analizar el reconocimiento de las muestras por el conjugado anti-IgAh empleado, se observó la presencia de IgAsh visiblemente superior en F1, resultado esperado teniendo en cuenta el tamaño molecular de la inmunoglobulina. En esta fracción se obtuvo reconocimiento en todas las concentraciones evaluadas desde (20 μ g/dot) (**Fig.8, F1**), lo cual demuestra la elevada concentración de la IgAsh en la misma.

FIGURA 8. Determinación de la presencia de IgAsh en fracciones cromatográficas mediante Dot blot.

F1, F2 y F3, fracciones de los picos de la cromatografía de gel filtración. Los carriles representan concentraciones decrecientes de las fracciones evaluadas



La presencia de esta Ig en las otras fracciones, pero en una evidente menor proporción, puede deberse al hecho de que la IgA suele formar agregados moleculares con otros componentes, lo cual incrementa su tamaño molecular y por tanto, posee un patrón de elución diferente y más tardío con respecto a la IgAs dimérica no agregada.

IV.1.3.2 SDS-PAGE

Las fracciones separadas por exclusión molecular fueron además analizadas mediante SDS-PAGE en gel de acrilamida al 12.5 %, bajo condiciones reductoras (**Fig.9**). Al evaluar la fracción 1 se observó la presencia de tres bandas, que por su tamaño molecular, pudieran corresponder con los componentes estructurales de la IgAsh (CS, CP y CL) (**Fig.9A, Carril 3**).

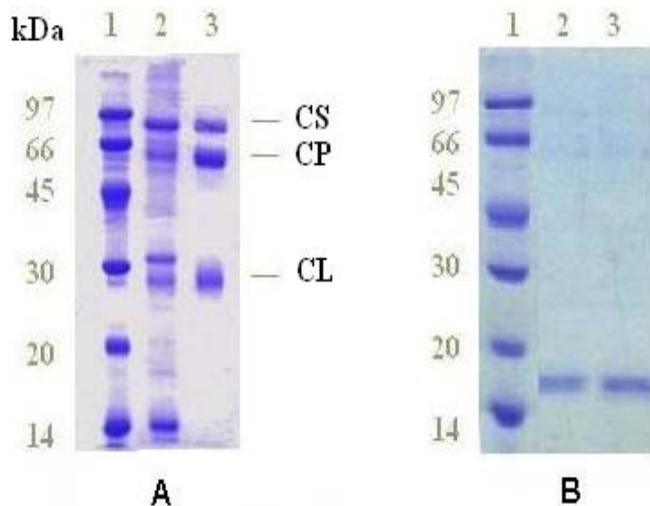


FIGURA 9. Determinación de la presencia de IgAsh en fracciones cromatográficas mediante SDS-PAGE. Se muestra el perfil proteico del calostro humano y fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular, en gel de poliacrilamida teñido con Azul Coomassie luego de la corrida electroforética **1A**, patrón de bajo peso molecular (Farmacia); **2A**, 10 μ L de calostro humano delipidado y descaseinado, diluido 1/20; **3A**, 10 μ L de F1 **1B**, patrón de bajo peso molecular (Farmacia); **2B**, 10 μ L de F2; **3B**, 10 μ L de F3

Sin embargo, al evaluar las fracciones F2 y F3 aplicadas en el dot blot, sólo se obtuvo la presencia de una banda que migró por debajo de los 20 y encima de los 14 kDa, lo cual pudiera estar relacionado con algún otro componente del calostro, evidenciándose la no presencia de IgAsh en estas muestras (**Fig.9B, Carriles 2 y 3**).

El peso molecular real de cada una de las bandas obtenidas en la fracción 1 se determinó mediante análisis densitométrico y los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis densitométrico de bandas obtenidas de fracción 1 en SDS-PAGE 12.5%.

Muestra	RF	PPM práctico	P teórico	Anti-log PPM práctico	Valor Reportado
CS	0,17	1,860098522	75	$\pm 72,46$	75
CP	0,28	1,751724138	50	$\pm 56,46$	50
CL	0,58	1,456157635	25	$\pm 28,59$	25

Como se refiere en la Tabla 1, los pesos moleculares reales de cada banda están en asociación con los valores reportados para cada uno de los componentes de la IgAsh (75 kDa para el CS, 50 kDa para la CP y 25 kDa, para la CL). Este resultado es muy similar al

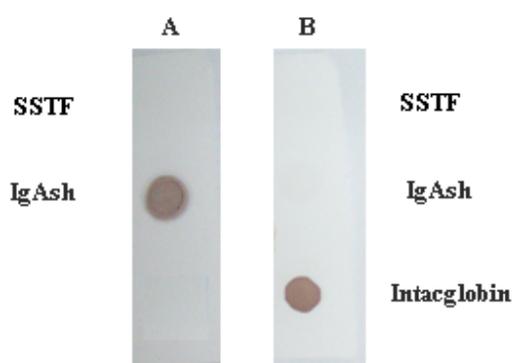
reportado en un estudio anterior donde se obtuvo IgAs a partir de calostro humano mediante una cromatografía de afinidad en matriz de agarosa-jacalina (Marcet y cols, 1999).

IV.1.4 Determinación de la presencia de IgG en la muestra de IgAsh purificada

A pesar de que por la combinación de métodos empleados en la purificación de IgAsh no debe aparecer IgG porque posee un punto isoeléctrico de 6.5-8 y un tamaño molecular de 150 kDa, se evaluó su posible presencia en la fracción de IgAsh purificada. Dicha evaluación se realizó para corroborar que en la fracción de IgAsh obtenida no había trazas de IgG, lo cual pudiera ser un contaminante que potencialmente afectara la posterior demostración de protección sólo por la IgAsh. Para ello se sometió a evaluación la IgAsh purificada frente a dos conjugados diferentes (**Fig.10**).

FIGURA 10. Determinación de IgG en muestra de IgAsh purificada, mediante dot blot. Se aplicó como control negativo SSTF (A y B) y como control positivo Intacglobin (B).

A, Reconocimiento de muestras por conjugado anti IgAh **B,** Reconocimiento de muestras por conjugado anti IgGh



Al enfrentar la muestra al conjugado anti-IgGh, sólo se observó reconocimiento frente al Intacglobin, no detectándose señal alguna en la muestra de IgAsh purificada de calostro (**Fig.10B**).

Se conoce que el contenido de Igs en el calostro es altamente dependiente de la especie animal (Butler y Kehrlí, 2005). Por otro lado, en el humano el perfil de Igs en el calostro es similar al encontrado en la leche, donde los niveles de IgA son elevados en ambas

secreciones, representando de un 88 a un 90% del total de todas las Igs. El calostro humano en especial tiene un bajo contenido de IgG (2%) (Pérez y cols, 1980) (**ANEXO 2**) y los niveles requeridos de esta Ig para proveer inmunidad sistémica son transferidos al neonato a través de la placenta antes del nacimiento (Hurley y Theil, 2011).

IV.2 Estudio del reconocimiento de IgAsh frente a antígenos de *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*.

IV.2.1 Western blot

Con el objetivo de estudiar la reactividad de la IgAsh purificada frente a Ags específicos de micobacterias, la muestra se sometió a análisis mediante western blot. Para esta evaluación, se aplicó en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12.5%, un lisado de células completas de *M. bovis* BCG y un lisado de células de *M. tuberculosis* y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La tira de nitrocelulosa incubada con calostro humano, mostró numerosas bandas de reconocimiento frente a los Ags de ambas micobacterias, pero con más intensidad frente a *M. bovis* BCG (**Fig.11, 1B y 2B**).

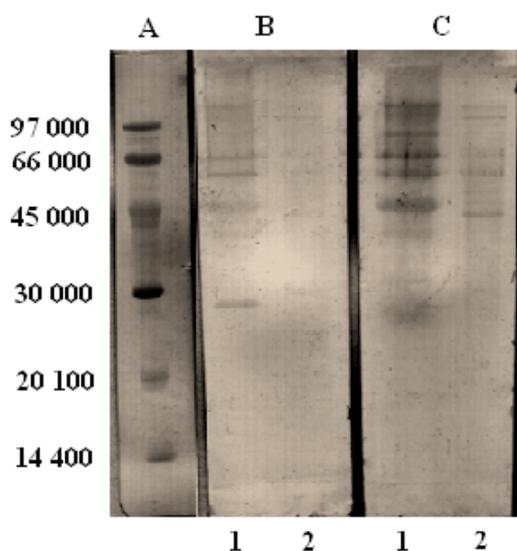


FIGURA 11. Reconocimiento de Ags de micobacteria por la IgAsh mediante Western blot. Los Ags separados por SDS-PAGE fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. Una membrana fue incubada con calostro humano y otra, con IgAsh purificada. Ambas membranas se enfrentaron a Ac específico contra IgAh. Se muestra el perfil de reconocimiento.

A, Patrón de bajo peso molecular (Pharmacia)
B, Calostro humano (1/20)
C, IgA humana (100 µg/mL)

1, lisado de *M. bovis* BCG (200 µg/mL)
2, lisado de *M. tuberculosis* (80 µg/mL)

Sin embargo, la tira incubada con la IgAsh purificada, mostró una mayor reactividad frente a los Ags de *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*, obteniéndose bandas más intensas, aunque con un patrón similar de mayor reconocimiento frente a los Ags de *M. bovis* BCG que frente a los de *M. tuberculosis* y dentro de los primeros, frente a una banda de 45 kDa (**Fig.11, 1C y 2C**). Esta banda de 45 kDa pertenece a un complejo de moléculas identificado en *M. bovis* BCG, de 45 y 47 kDa, el cual se conoce que interactúa con Acs presentes en el suero de curieles inmunizados con bacteria viva (Romain y cols, 1993).

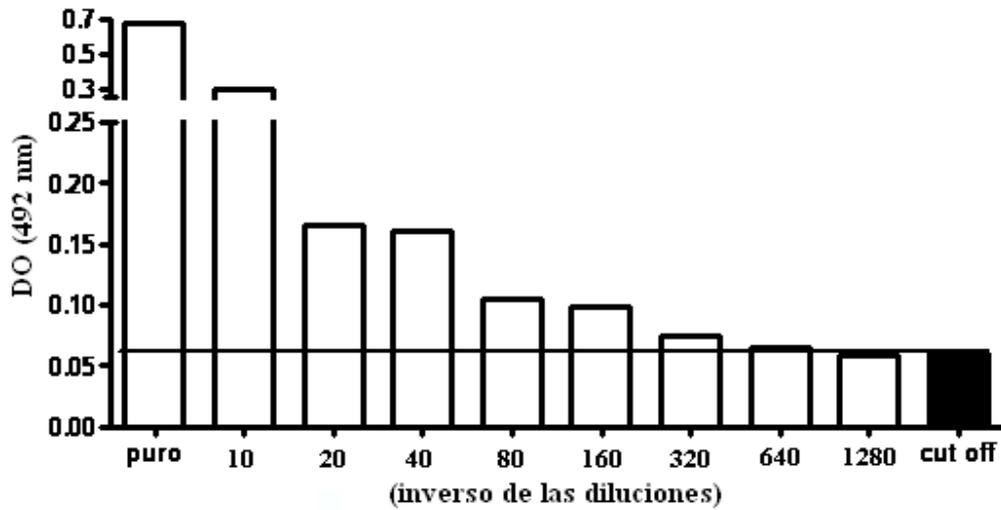
Un efecto similar al mostrado por la tira incubada con IgAsh se obtuvo en un estudio previo, al evaluar la reactividad del intactoglobin (Olivares y cols, 2009). En ese estudio se transfirieron Ags de estas mismas micobacterias, demostrándose un reconocimiento mayor frente a los Ags de *M. bovis* BCG que a los de *M. tuberculosis*.

IV.2.2 ELISA

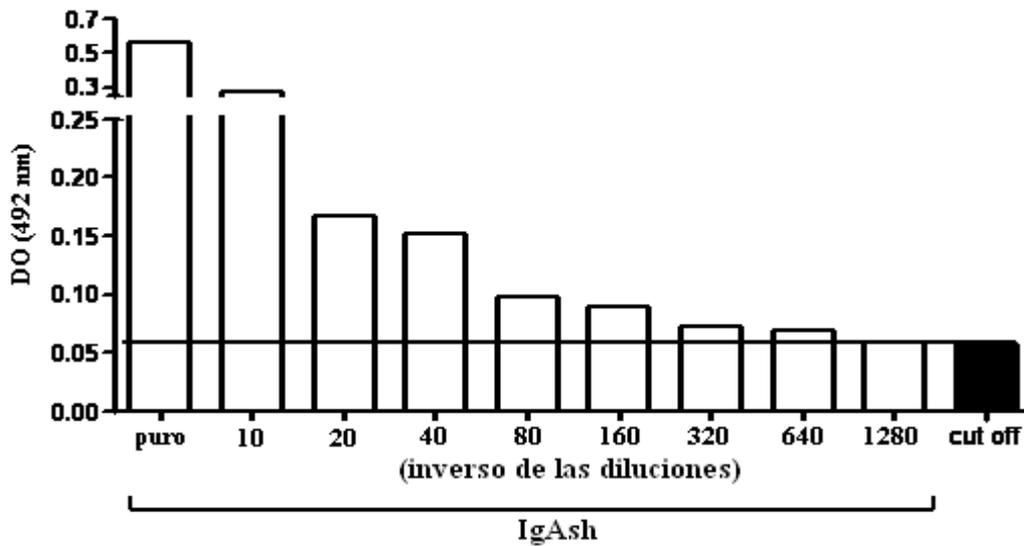
Adicionalmente, evaluamos la reactividad de la IgAsh purificada de calostro, frente a células enteras de *M. bovis* BCG y de *M. smegmatis* (**Fig.12A y B**). Para ello empleamos la muestra de IgAsh purificada pura (10 µg/mL) y diluciones doble seriadas a partir de 1/10 y hasta 1/1280. Los resultados mostraron que la IgAsh tiene una elevada reactividad frente a los Ags de *M. bovis* BCG (1/320) y que esta reactividad es mayor frente a los Ags de *M. smegmatis* (1/640).

Las vías más probables de sensibilización de la IgAsh frente a los Ags de micobacterias pueden ser producto de:

- la **vacunación con BCG**, vacuna que se encuentra incluida en el Programa Nacional de Inmunizaciones de Cuba. Diferentes estudios han demostrado que la inmunización por vía parenteral puede inducir producción de anticuerpos en secreciones.



A



B

FIGURA 12. Reconocimiento de Ags de micobacteria por la IgAsh mediante ELISA indirecto. Se emplearon células enteras de *Mycobacterium bovis* BCG (A) y *Mycobacterium smegmatis* (B), frente a la inmunoglobulina A humana secretora obtenida de un pool de calostro humano.

Por ejemplo, Svennerholm y colaboradores evaluaron los niveles de Ac contra LPS de *V. cholerae* en muestras de suero, leche y saliva, de un grupo de mujeres, antes y después de la vacunación contra cólera por vía subcutánea. Antes de la inmunización todas las

mujeres tenían niveles bajos de Ac IgM y en muchos casos, niveles elevados de IgA contra cólera en leche y saliva, indicando una exposición natural temprana. Los resultados revelaron elevados títulos de IgA en las secreciones (70% en leche y 45% en saliva), indicando que la vacunación contra cólera por vía parenteral puede inducir una respuesta local de IgAs (Svennerholm y cols, 1980). Otro estudio evaluó los niveles de Ac en suero y mucosa como respuesta a la vacunación con cápsulas de polisacárido de *H. influenzae* tipo b, en niños y adultos. En este caso, todos los sujetos respondieron a la vacunación parenteral con un incremento en los niveles de Acs anti-capsulares, sugiriendo que la administración parenteral puede inducir respuesta de Ac a nivel mucosal (Pichichero e Insel, 1983). Adicionalmente, un estudio realizado en monos inmunizados por vía parenteral con una vacuna disintérica de *S. sonnei* ribosomal y posteriormente retados con una cepa virulenta de *S. sonnei*, mostró que con una sola dosis de inoculación se obtiene un considerable incremento en los niveles de IgA, IgG e IgM contra LPS en saliva (Dzhikidze y cols, 1988). Kaveh y colaboradores inmunizaron ratones Balb/c con BCG por vía intradérmica 6 semanas antes del reto con *M. bovis* BCG y demostraron que esta vacunación induce poblaciones de células T efectoras de memoria a nivel mucosal y sistémico en los ratones vacunados (Kaveh y cols, 2011).

Estudios previos han reportado que el Intacglobin, una fracción con abundantes isotipos de Acs, protege contra la infección por *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*, probablemente debido al reconocimiento de Acs micobacterianos (Olivares y cols, 2006). Adicionalmente, se demostró que la vacunación intranasal de ratones con BCGr, induce la expresión de elevados niveles de Acs en suero contra *Schistosoma haematobium*, así como elevados niveles de IgA específica mucosal en lavado bronco-alveolar (Kremer y cols, 1998).

Previo a nuestro trabajo se realizó un estudio donde se evaluó el suero de pacientes con enfermedad de Crohn y se demostró una elevada respuesta de IgA frente a *M.*

tuberculosis, *M. avium* y *M. gordonae* mediante ELISA. Esta respuesta fue más intensa contra el extracto de isopentanol de células completas que frente al extracto de proteínas solubles (Wayne y cols, 1992). Otro estudio demostró que pacientes adultos con TB tienen respuesta de IgA específica contra Acs glicolipídicos (Julian y cols, 2002) y Miranda y colaboradores evidenciaron la reactividad de la IgA frente a Acs aislados luego de la sonicación de cepas clínicas de *M. tuberculosis*, mayoritariamente frente a los Acs de naturaleza glicolipídica (Miranda y cols, 2009).

- el hecho de que **la infección con *M. tuberculosis* tiene una prevalencia elevada en la población mundial** donde 1/3 de esta se encuentra infectada con el bacilo.

- **la exposición a micobacterias ambientales**, cuya entrada al hospedero se produce en muchos casos por vía oral, siendo esta reportada como la vía que estimula la producción de Acs en el tejido mamario. Se ha sugerido que la exposición a micobacterias ambientales no patogénicas puede influir en el curso y desarrollo de la infección por *M. tuberculosis* y *M. leprae* y que además, puede afectar la eficacia de la vacunación con BCG contra la TB pulmonar (Brandt y cols, 2002). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual las micobacterias ambientales pueden influir sobre la respuesta inmune no ha sido identificado. En nuestro país se identificaron 80 cepas pertenecientes a 17 especies de micobacterias ambientales (Mederos y cols, 1997). Adicionalmente, se evaluó la interacción de *M. smegmatis* con monocitos modulando su diferenciación en CD y los resultados sugieren que la exposición a micobacterias ambientales puede modular la diferenciación de CD haciéndolas capaces de migrar hacia órganos linfoides secundarios y modular la respuesta inmune adaptativa. Esto puede explicar uno de los mecanismos por los cuales las micobacterias ambientales pueden influir en la respuesta inmune frente a especies patógenas (Martino y cols, 2005).

- No es sorprendente la reactividad de la IgA_s, observada en nuestro trabajo, frente a los

Ags de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, teniendo en cuenta que el elevado y similar reconocimiento podría explicarse por **la conservación de los Ags en el género Mycobacterium y su amplia reactividad cruzada.**

M. bovis integra, junto a *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum* y *M. canneti*, el complejo *M. tuberculosis* (Berth, 2008). *M. bovis* y *M. tuberculosis* se encuentran altamente relacionados a pesar de sus variaciones en cuanto a hospedero preferente, poder patogénico, distribución geográfica, epidemiología y algunas características fisiológicas tales como la morfología de las colonias, el patrón de resistencia y la susceptibilidad a inhibidores (Berth, 2008).

Al igual que *M. tuberculosis*, *M. bovis* es una micobacteria de crecimiento lento y aunque poseen variación en sus componentes de pared celular y proteínas secretadas, ambos genomas comparten un 99.95% de homología a nivel nucleotídico (Hsu y cols, 2003).

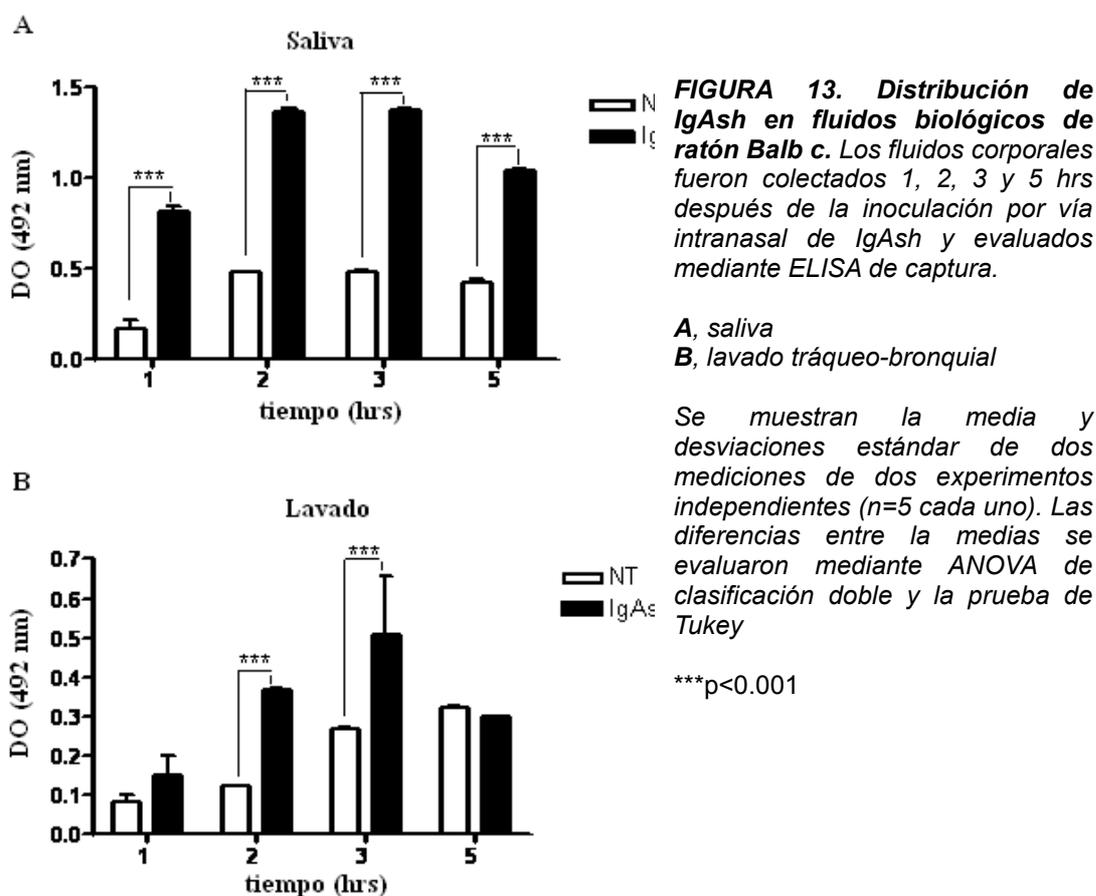
Por otro lado, *M. smegmatis* es una micobacteria saprófita, no patogénica, de rápido crecimiento, que no entra a células epiteliales y no persiste en fagocitos profesionales, además de que no posee las propiedades patogénicas de *M. tuberculosis* (Wang y cols, 2005). Su genoma es aproximadamente 1.7 veces más grande que el de *M. tuberculosis* y se encuentran alejados filogenéticamente en 4 tiempos de generación, lo cual pudiera hacer pensar en grandes diferencias en cuanto a su genoma. Sin embargo, un estudio previo estudió 901 proteínas del total de 8 968 que posee *M. smegmatis* y demostró, mediante cromatografía multidimensional y espectrometría de masa, que 701 de ellas poseen elevada homología con proteínas de *M. tuberculosis*, representando un 78.7% de similitud de secuencia entre ambas especies (Wang y cols, 2005). Adicionalmente, se demostró en un trabajo anterior que de los 19 genes de *M. tuberculosis* relacionados con la virulencia de la micobacteria, 12 tienen elevada homología con *M. smegmatis*, lo cual hace de esta especie un modelo ventajoso para estudiar la virulencia de *M. tuberculosis*

(Reyrat y Kahn, 2001).

No obstante, no hemos encontrado reportes previos sobre el reconocimiento de Ags de micobacterias por la IgAs de calostro humano.

IV.3 Estudio de la cinética de distribución de IgAsh en muestras de suero, saliva y lavado tráqueo-bronquial, luego de su administración a ratones por vía intranasal.

La presencia de la IgAsh purificada de calostro en los fluidos biológicos se determinó mediante ELISA de captura, luego de su administración por vía intranasal a ratón Balb/c



(Fig.13).

Los resultados del estudio mostraron que los niveles de IgAsh presentes en la saliva de los animales del grupo IgAsh fueron superiores y estadísticamente significativos con

respecto a los detectados en la saliva de los ratones inoculados con solución salina, constatándose este resultado en todos los intervalos de tiempo evaluados (**Fig.13A**). La presencia de IgAsh en el lavado tráqueo-bronquial se determinó en los mismos intervalos de tiempo y se observaron niveles estadísticamente significativos en los ratones que recibieron el Ac, 2 y 3 hrs posteriores a la inoculación, con respecto a los niveles determinados en los ratones del grupo NT (**Fig.13B**).

Se determinó la presencia de IgAsh en las muestras de suero de ratón en iguales intervalos de tiempo porque nunca antes se había estudiado la distribución de este Ac, pero como esperábamos, los resultados no mostraron niveles de la Ig en ninguno de los animales y tiempos estudiados (*datos no mostrados*). Los resultados no son sorprendentes debido a que estamos en presencia de un Ac de tipo secretor cuyos niveles sólo debían detectarse en las muestras de saliva y lavado tráqueo-bronquial, después de su administración por vía intranasal.

En un estudio previo se evaluó la distribución en fluidos mucosales, de un AcM IgA contra la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis* (TBA61) y se determinó su presencia 1, 3, 6 y 24 hrs posteriores a la inoculación por vía intranasal (Falero y cols, 2000). Los autores reportaron un pico en los niveles de TBA61 en saliva a las 3 hrs de evaluación, con una posterior disminución a las 6 hrs. 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 evaluó la presencia de IgGh después de la administración de Intacglobin, en muestras de saliva, lavado tráqueo-bronquial y suero 1, 2, 3 y 5 hrs posteriores a la inoculación por vía intranasal a ratones Balb/c (Olivares y cols, 2006). La presencia de títulos de gammaglobulina en las muestras de saliva fue detectada a partir de 1 hr y hasta 2 hrs, descendiendo después de este tiempo hasta hacerse cero al cabo

de las 3 hrs posteriores a la inoculación. Sin embargo, los niveles de la gammaglobulina 1 hr después de la inoculación fueron mayores en lavado tráqueo-bronquial que en saliva, con un pico máximo a las 3 hrs y niveles despreciables a las 5 hrs. Correspondiendo con nuestros resultados, los autores reportaron que los niveles de gammaglobulina en suero fueron nulos en todos los intervalos de tiempo estudiados.

En nuestro trabajo se evidencia una permanencia de la IgAsh hasta 5 hrs en saliva, posteriores a la inoculación por vía intranasal. Debemos tener en cuenta que en los estudios previos de biodistribución, se evaluó la presencia de los Acs empleando placas de ELISA recubiertas con lisado de células completas de *M. bovis* BCG. Sin embargo, en nuestro caso, la presencia de la IgAsh fue determinada mediante un ELISA de captura, recubriendo las placas con anti IgAh obtenido de conejos inmunizados con la IgAsh purificada del calostro humano, lo cual confiere una mayor sensibilidad en la detección.

Adicionalmente, el hecho de que en nuestro estudio la IgAsh haya permanecido más tiempo en saliva con respecto a los reportes previos, puede deberse a que en su estructura se encuentra el CS. La presencia del CS en la estructura de la IgAs viene dada por la unión de la IgA al pIgR, en la membrana basolateral de las células epiteliales. El pIgR posee una región extracelular que consiste en 5 dominios (D1-D5) (Norderhaug y cols, 1999), los cuales están implicados en la unión de la IgA a este receptor. El CS se une a la IgA en su porción Fc (Bonner y cols, 2009) y de esta forma, protege residuos susceptibles de degradación por proteasas (Brandtzaeg, 2009).

El CS se encuentra altamente glicosilado en su estructura con 7 sitios de N-glicosilación y los azúcares representan el 25% de su masa molecular (Brandtzaeg, 2009). Un elemento importante consiste en que los residuos de carbohidratos del CS son considerados responsables del anclaje de la IgAs a la superficie mucosal, debido a que en su estructura posee regiones oligosacáridicas similares a las presentes en las mucinas (Royle y cols,

2003). Las mucinas son glicoproteínas producidas en el epitelio o glándulas submucosales como el mayor constituyente macromolecular del mucus y el responsable de la viscosidad del gel mucoso (Royle y cols, 2003). La molécula de IgAs está glicosilada en las posiciones conservadas en sus regiones constantes y se ha demostrado que la naturaleza y estructura de los carbohidratos afectan su función (Wright y Morrison, 1997). La presencia de la IgAs recubriendo las superficies mucosales en el tracto respiratorio es garantizada, esencialmente, por la inducción local de respuesta secretora o por la administración pasiva de IgA asociada al CS. Phalipon y colaboradores enfatizaron la influencia que tiene el ambiente local en la estabilidad del Ac con la IgA como ejemplo, la cual es estable en un ambiente estéril como el pulmón en hospederos sanos, pero menos estable en el tracto gastrointestinal, donde las enzimas proteolíticas y la flora local representan la mayor fuente de proteasas (Phalipon y cols, 2002). Resultados obtenidos por Reynolds demuestran que el CS contribuye significativamente a la protección del tracto respiratorio debido a su influencia en la localización de la IgAs *in vivo*, lo cual afecta en consecuencia la localización de la bacteria. De esta forma, cuando está presente el CS, la IgA aparece asociada a la mucosa nasal y bronquial, sin difundir a los compartimentos alveolares. Sin embargo, en ausencia del CS, la IgAs falla en su asociación al mucus y a su vez, en la prevención de la infección en el tracto respiratorio en ratones, sugiriendo tanto la importancia fisiológica de las interacciones entre las mucinas y la IgAs como el papel de los residuos carbohidratos del CS en mantener dicha interacción (Reynolds, 1991).

Estos resultados son consistentes con la localización de la IgAs en la vecindad de la mucosa, donde generalmente es atrapada en el mucus, induciendo una respuesta local en el tracto respiratorio (Reynolds, 1991). La IgAs, a través de su unión al moco por medio del CS, forma un escudo en la interfaz entre las bacterias invasoras y las células

epiteliales, lo cual explica su particular eficiencia como mediador de la exclusión inmune.

IV.4 Evaluación de la capacidad protectora de la administración de IgAsh por vía intranasal, en un modelo murino de infección intratraqueal con *M. tuberculosis*.

Teniendo en cuenta que la IgAsh reconoce Ags de micobacterias y tiene la capacidad de permanecer durante varias horas en fluidos biológicos de ratón después de su administración por vía intranasal, así como que AcM de IgA contra 16 kDa de *M. tuberculosis* puede modificar el curso de la infección por este patógeno (Reljic y cols, 2006b), resulta interesante evaluar la capacidad de la IgAsh como candidato profiláctico frente a la infección con *M. tuberculosis*. Para ello se administró la IgAsh por vía intranasal y se evaluó la capacidad protectora de esta antes de la infección con *M. tuberculosis*, así como la capacidad protectora de *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh antes del reto, lo cual no ha sido explorado previamente.

En nuestro trabajo se empleó el modelo experimental de TB pulmonar progresiva, desarrollado por el Dr. Rogelio Hernández-Pando y colaboradores, caracterizado por el uso de animales genéticamente idénticos (*cepa Balb/c*), los cuales se infectan por la vía natural (*inyección intratraqueal*) con bacterias vivas y virulentas (*cepa prototipo H37Rv*). La dosis de bacterias empleada para infectar a los ratones es elevada, puesto que estos animales no son huéspedes naturales de las micobacterias (Hernández-Pando y cols, 1995). El modelo tiene como principal ventaja que la inyección intratraqueal permite un mejor control de la dosis y garantiza que la mayoría, sino es que todas las bacterias, realmente se depositen en el pulmón. Estas son ventajas sobre el uso de nebulizadores como instrumentos de infección, pues con estos se puede permitir la deglución de las bacterias y en consecuencia, la estimulación del tejido linfoide asociado a la mucosa digestiva, lo cual seguramente modifica de manera significativa la respuesta inmunológica

sistémica (Hernández-Pando y cols, 2004).

IV.4.1 Determinación de la carga bacteriana en el pulmón

Los resultados indicaron que 1 y 7 días después de la infección con *M. tuberculosis*, todos los grupos evaluados mostraron un comportamiento similar en términos de UFC en las muestras de pulmón (**Fig.14**). Sin embargo, 30 y 60 días posteriores a la infección con *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh, los ratones mostraron una disminución estadísticamente significativa del número de bacterias en pulmón, comparado con los ratones del grupo NT, los cuales recibieron SS antes del reto con *M. tuberculosis* ($p < 0.001$) (**Fig.14**) y, a su vez, comparado con el grupo de ratones que recibió la IgAsh purificada y después, el reto con la micobacteria por vía intratraqueal ($p < 0.01$) (**Fig.14**).

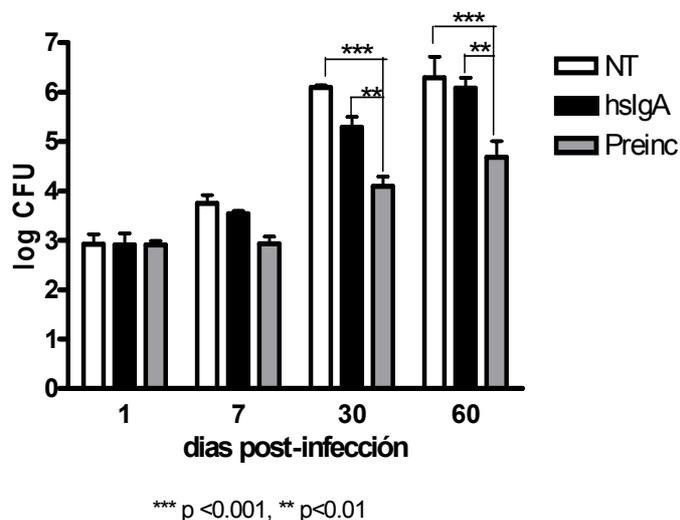


FIGURA 14. Determinación de la carga bacteriana en pulmones de ratones NT y tratados con IgAsh y tratados con *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh. Los animales del grupo NT y los tratados con IgAsh fueron retados con *M. tuberculosis* H37Rv por vía intratraqueal 2 hrs después de la inoculación. Los animales del grupo Preinc recibieron la micobacteria preincubada con IgAsh, 4 hrs antes de ser administrada por vía intranasal. Los datos fueron procesados como log 10, empleando el Software GraphPad Prisma 4. Se muestran la media y desviaciones estándar de tres mediciones de dos experimentos independientes ($n=5$ cada uno). Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante ANOVA de clasificación doble y la prueba de Tukey.

Por otro lado, no se obtuvo diferencia significativa en la reducción de la carga bacteriana en los pulmones del grupo que recibió la IgAsh comparado con el grupo NT. El hecho de

que el grupo que recibió la micobacteria previamente incubada con la IgAsh mostrara una disminución significativa con respecto al grupo NT, sugiere que el reconocimiento de los Ags de la micobacteria por el Ac inhibe la capacidad invasiva de la bacteria por diferentes mecanismos.

M. tuberculosis, gana acceso al hospedero a través de la mucosa de los alveolos pulmonares, de manera que la presencia de Acs específicos en las secreciones mucosales puede inhibir la colonización por la micobacteria (Acosta y cols, 2010).

El modelo de co-administración ha sido empleado por diversos estudios, donde la micobacteria ha sido incubada con AcM antes de la administración a ratones. Por sólo citar algunos, Teitelbaum y colaboradores evaluaron el posible reconocimiento de un AcM murino IgG3 frente a Ags de superficie de *M. tuberculosis*, así como su capacidad de afectar la supervivencia de ratones Balb/c. Como parte del esquema experimental empleado, estos autores preincubaron *M. tuberculosis* con el AcM durante 4 hrs a temperatura ambiente, con el objetivo de simular la asociación del Ac con la micobacteria en el microambiente pulmonar. Como resultado, los ratones que recibieron la micobacteria preincubada con el AcM mostraron una marcada formación de granulomas en las secciones histopatológicas de pulmón con respecto a los ratones del grupo control, asociado proporcionalmente con el porcentaje de supervivencia (Teitelbaum y cols, 1998). En otros estudios, los efectos benéficos se obtuvieron cuando los AcM fueron administrados entre 1-3 hrs antes de la infección o 3 hrs antes y 3 días después de la infección (Glatman-Freedman y cols, 2000; Williams y cols, 2004; López y cols, 2009).

Otro estudio previo reportó el pre-tratamiento de micobacterias patógenas con suero inmune de conejo, lo cual demostró que promueve la fagocitosis y facilita la fusión lisosomal, pero no induce la muerte del patógeno (Armstrong y Hart, 1975). Por otra parte, la activación previa de macrófagos con IFN- γ fue reportada con una función similar

(Schaible y cols, 1998). Estos resultados indican que en cierto modo, la incubación de *M. tuberculosis* con Acs, previa a su administración a los ratones, puede afectar la internalización de la bacteria y el subsecuente curso intracelular dentro de los macrófagos infectados, similar al efecto del IFN- γ sobre los macrófagos.

Adicionalmente, se han evaluado modelos murinos con deficiencia en la producción de Acs, con el objetivo de estudiar el papel de estos en la protección contra las infecciones micobacterianas. Un ejemplo importante son los estudios en ratones *knockout*. Rodríguez y colaboradores inmunizaron ratones deficientes en IgA y ratones no deficientes, por vía intranasal con PstS-1, Ag de la superficie micobacteriana. Los autores mostraron que los ratones deficientes en IgA fueron más susceptibles a la infección con BCG, comparado con los ratones no deficientes, revelado por la elevada carga bacteriana en pulmón y lavado bronqueo-alveolar. El análisis de citoquinas reveló una reducción en la producción de IFN- γ y TNF- α en pulmón de los ratones deficientes, comparado con los ratones no deficientes, sugiriendo que la IgA juega un papel importante en la protección contra las infecciones por micobacterias en el tracto respiratorio. Estos autores demostraron que los ratones deficientes en pIgR son más susceptibles a la infección con BCG que los ratones no deficientes inmunizados (Rodríguez y cols, 2005).

En 1996, Vordermeier y colaboradores desarrollaron un modelo de infección de TB en ratones *knockout* para la cadena μ de IgG. Los órganos de los ratones deficientes e infectados con *M. tuberculosis* tuvieron de 3 a 8 veces mayor número de bacterias viables comparado con los procedentes de los ratones no deficientes. Este resultado sugiere que las células B están relacionadas con la contención de la infección por TB en ratón (Vordemeier y cols, 1996).

En otra serie de experimentos ha sido evaluado el papel de las células B durante la respuesta inmune primaria a la infección con aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*

(CDC 1551). Los autores observaron una formación reducida de granulomas en pulmón y mayor diseminación de la bacteria, desde el pulmón hacia los órganos periféricos, en ratones con genes disruptos de células B (Bosio y cols, 2000).

La preincubación de la micobacteria con el Ac constituye un modelo artificial en la naturaleza pero que permite simular que pasaría en el microambiente pulmonar si a la llegada de la micobacteria, existieran suficientes niveles de Ac. La preincubación de *M. tuberculosis* y AcM ha sido empleada para estudiar la distribución y el crecimiento de la micobacteria en diferentes órganos. Adicionalmente, se ha visto que el Ac pre-tratado puede derivar en diferencias en la respuesta inmune del hospedero a la primera exposición con la micobacteria. Estudios previos han mostrado que la presencia de Ac en la superficie de la micobacteria influye en la presentación de Ag a células T CD4+ (Coughlan y cols, 1996), además de que la opzonización de la micobacteria por el Ac puede promover la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos (Hussain y cols, 2001).

Este modelo además puede ser empleado como herramienta en el estudio y evaluación de la carga bacteriana en órganos y en la supervivencia (Olivares y cols, 2006; Chambers y cols, 2004).

A pesar de todas las ventajas que ofrece este modelo, la preincubación solo es una herramienta empleada en nuestro trabajo para demostrar la prueba de concepto acerca de que la IgAsh protege frente a la infección experimental con *M. tuberculosis*. Por tal razón, recomendamos evaluar otros esquemas de inmunización para determinar la cantidad de Ac necesaria teniendo en cuenta que en la naturaleza los individuos no se infectan por vía intratraqueal directamente, la micobacteria no entra al hospedero preincubada con el Ac y la dosis de infección es muy inferior a la utilizada en nuestro estudio.

El hecho de que en nuestros resultados el efecto protector sea evidente a partir de 30 días después de la infección, tiempo al cual ya la IgA_s debe haber sido aclarada del sitio de administración, sugiere que el Ac puede ejercer su potencial efecto protector, probablemente de forma indirecta, mediante la activación de mecanismos de la inmunidad mediada por células. Los esfuerzos encaminados a entender la biología de las células B y su relación con la TB, han mostrado que estas pueden tener una influencia significativa en la producción de citoquinas, contención de los bacilos y progresión inmunopatológica durante la infección con *M. tuberculosis* (Maglione y Chan, 2009). Un posible mecanismo propuesto consiste en la acción de las células B sobre los receptores Fc γ , influyendo en la maduración de las APC para producir fenotipos de ratones deficientes de genes, retados con *M. tuberculosis*. Sin embargo, este es sólo un mecanismo a través del cual los linfocitos B pueden modular la respuesta del hospedero frente a la infección por TB. Se han propuesto numerosos mecanismos mediante los cuales los Acs pueden actuar contra la TB y estos son resumidos en la Tabla 2 (Glatman-Freedman, 2011 en prensa).

Tabla 2. Mecanismos contra TB mediados por Acs

- Mecanismos antimicobacterianos directos

- Neutralización de toxinas
- Inhibición del crecimiento
- Mecanismo antimicobacteriano adicional (Opsonización)

- Mecanismos inmunoreguladores

- Efectos en la expresión de citoquinas
 - Activación del complemento
 - Promoción de la fusión fagosoma-lisozoma
 - Promoción de la inmunidad mediada por células
 - Activación de la presentación de antígenos
 - Mecanismo inmunoregulador adicional (Mediación en la citotoxicidad celular dependiente de Ac)
-

*IV.4.2 Estudio morfométrico e histopatológico en pulmón de ratones Balb/c retados con *M. tuberculosis* por vía intratraqueal.*

IV.4.2.1 Estudio morfométrico

Al analizar los resultados del estudio morfométrico, se observó que a los 30 días de evaluación después de la infección, los pulmones de los ratones infectados con *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh mostraron un menor por ciento de área neumónica que los ratones del grupo NT ($p < 0.05$) (**Fig.14 y Fig.15**).

A los 60 días posteriores a la infección, los ratones que recibieron *M. tuberculosis* preincubado con la IgAsh y los ratones que recibieron la IgAsh purificada antes de la infección con la micobacteria, mostraron una disminución significativa del por ciento de las áreas neumónicas con respecto a los ratones del grupo NT ($p < 0.001$ y $p < 0.01$) (**Fig.15**), respectivamente.

Este efecto es similar a los resultados obtenidos en un trabajo que evaluó el efecto de la administración de un AcM 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 esa formulación (López y cols, 2009).

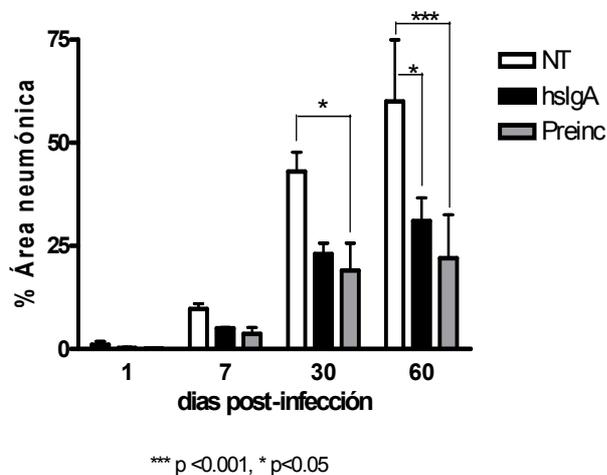


FIGURA 15. Determinación del área neumónica en pulmones de ratones NT, tratados con IgAsh y tratados con *M. tuberculosis* preincubado con IgAsh. Los animales de los grupos NT y tratado con IgAsh fueron retados con *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal 2 hrs después de la inoculación. El grupo Preinc recibió la micobacteria preincuba a 4 hrs antes de su administración, por vía intratraqueal. El estudio morfométrico se realizó empleando Microscopio Leica y Sistema Software Leica-win. Los datos fueron procesados empleando el Software GraphPad Prisma 4. Se muestran la media y desviaciones estándar de tres mediciones de dos experimentos independientes (n=5 cada uno). Las diferencias entre la medias se evaluaron mediante ANOVA de clasificación doble y la prueba de Tukey.

La capacidad protectora de los candidatos vacunales contra la infección con *M. tuberculosis* se evalúa determinando el tiempo y por ciento de supervivencia de los animales, así como después del sacrificio mediante el análisis de la carga bacteriana y la observación de cambios patológicos (Tyagi y Khera, 2004). Se consideran como indicadores de protección la reducción de la carga bacteriana en bazo y pulmón y la disminución del por ciento de consolidación neumónica en pulmón (determinado por estudios histopatológicos y morfométricos) (Tyagi y Khera, 2004).

A pesar de que la determinación de la carga bacteriana ha sido considerada el marcador clásico para evaluar el efecto en la protección frente a la infección, se plantea que no es suficiente, por sí sólo, para evaluar el potencial protector frente a la infección por *M. tuberculosis*. Estudios previos reportan la asociación del uso de AcM con la prolongación de la supervivencia sin cambios en las UFC, sugiriendo que no es suficiente el uso de este parámetro como única medida cuantitativa de la eficacia de los Acs contra la infección por micobacterias. Una dicotomía similar entre las UFC y los hallazgos

histopatológicos se observó con *C. neoformans*, donde los Acs prolongaron la sobrevida y estimularon la inflamación, pero no afectaron las UFC, al menos en las etapas tempranas de la infección (Feldmesser y Casadevall, 1997). Interesantemente el AcM5c11, un IgM que reconoce tanto al LAM como al AM, no tuvo efecto sobre la carga bacteriana, pero indujo cambios histopatológicos y formación de granulomas en pulmón (Teitelbaum y cols, 1998). El incremento de sobrevida también se observó al administrar, por vía intravenosa, *M. bovis* preincubado con AcMBS43 a ratones Balb/c, con respecto al grupo control (Chambers y cols, 2000). En este caso la sobrevida estuvo asociada con la reducción del tamaño de los granulomas y la disminución de áreas de necrosis en pulmón (Chambers y cols, 2000). Estos ejemplos demuestran que ciertos Acs, que reconocen epitopes asociados a la superficie, son capaces de mediar efectos benéficos en la sobrevida de los animales infectados con micobacteria. Es por ello que, además de este análisis, realizamos un estudio morfométrico de los cortes de tejido pulmonar, con el objetivo de evaluar la presencia de cambios histológicos luego de la administración de la IgAsh, ya sea en su forma natural, o previamente incubada con la micobacteria.

IV.4.2.2 Estudio histopatológico

El análisis histopatológico reveló que los animales del grupo NT manifiestan extensas áreas de neumonía que llegan a generalizarse en la mayor parte del tejido pulmonar, al cabo de 60 días posteriores a la infección (**Fig. 16A**). Sin embargo, los animales del grupo Preinc, sacrificados 30 días después de la infección con *M. tuberculosis*, presentan formación de granulomas numerosos, mejor formados y aislados, que afectan diferentes áreas del parénquima pulmonar, caracterizados por la presencia de abundantes macrófagos y focos de necrosis (**Fig. 16C**).

De forma similar, se observaron estos focos principalmente en las células que se

encuentran rodeando los alveolos, así como una discreta acumulación de linfocitos y el establecimiento de procesos como bronquiectasia y atelectasia, con depósito de fibrina y células epitelioides. Los animales que recibieron IgAsh y luego el reto con la micobacteria, mostraron una marcada tendencia a la organización del proceso granulomatoso, con disminución del área afectada, pero en menor proporción que en los animales del grupo Preinc.

Los animales sacrificados 60 días posteriores a la infección, pertenecientes tanto al grupo IgAsh como al grupo Preinc, mostraron extensas áreas de granulomas con focos de linfocitos en la periferia y abundante activación de macrófagos (**Fig.16 B y D**). Sin embargo, este efecto fue más marcado en el grupo Preinc, acompañado de una reducción más notable de las áreas neumónicas con respecto al grupo NT ($p < 0.001$), (**Fig. 16D**).

Los granulomas son estructuras histopatológicamente distintivas de la TB y corresponden a un tipo de inflamación crónica producida por la presencia de material poco o no biodegradable (Hernández-Pando y cols, 2000). Los mismos están constituidos por el acúmulo de linfocitos y macrófagos organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos y se les considera como las estructuras fundamentales para contener a las bacterias. Durante la fase temprana de la infección en este modelo experimental, específicamente en la segunda semana post-infección, los granulomas empiezan a formarse y una semana después alcanzan su máxima madurez (Hernández-Pando y cols, 1996). Estos granulomas de fase temprana y el infiltrado inflamatorio intersticial y perivenular coexistente, están constituidos principalmente por linfocitos TCD4 de tipo 1 productores de las citoquinas IFN- γ e IL-2 y macrófagos activados productores de TNF- α e IL-1 (Hernández-Pando, 1997).

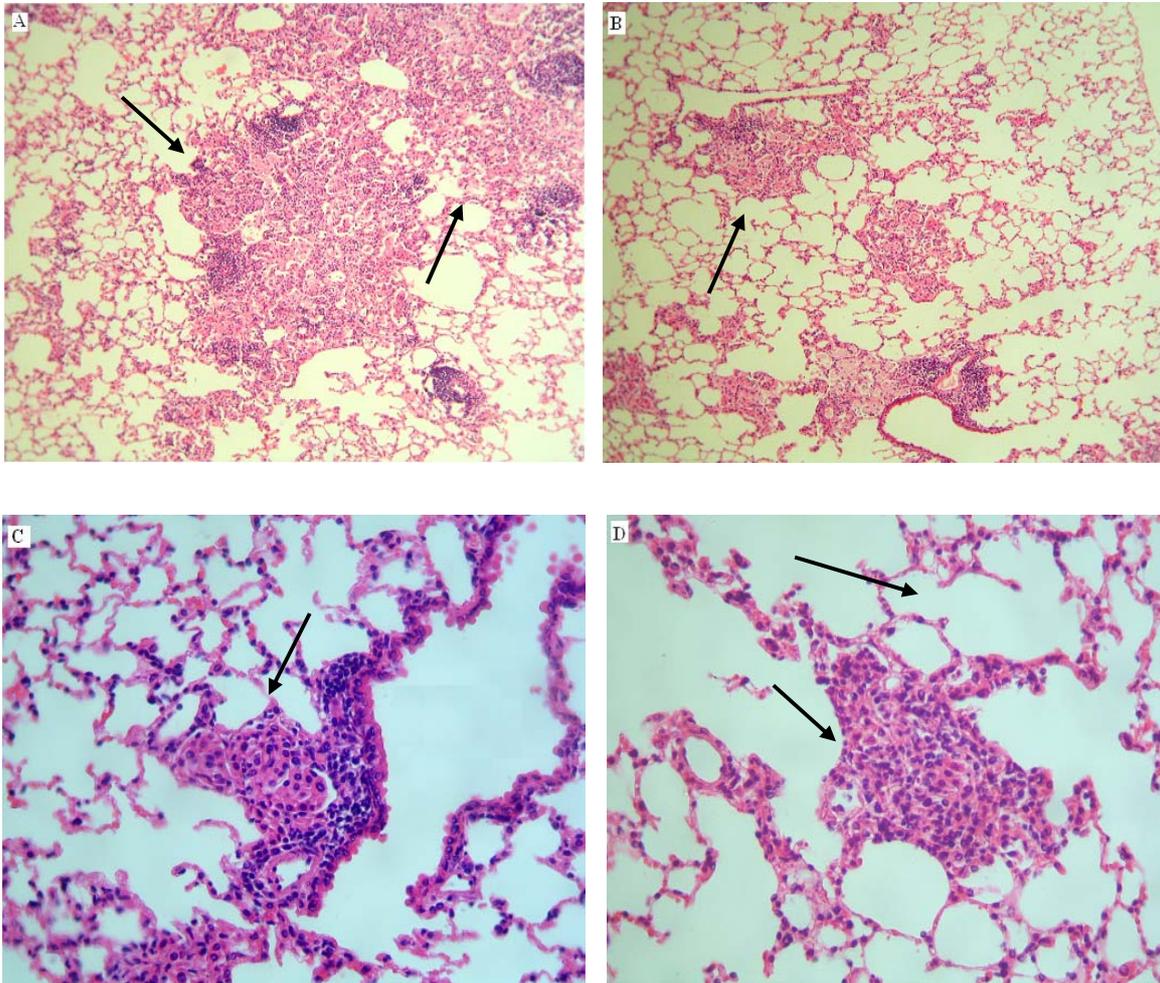


FIGURA 16. Microfotografía de pulmones provenientes de ratones Balb/c después de 30 y 60 días de infección intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se evaluaron en un analizador de imágenes acoplado a microscopio ZIDAS (Zeiss Interactive Digital System).

A, Grupo NT 60 días (10x); sección de pulmón del grupo NT, las flechas indican extensas áreas de neumonía generalizada

B, Grupo IgAsh 60 días (10x); de pulmón del grupo IgAsh la flecha muestra la presencia de granuloma

C, Grupo Preinc 30 días (40x) y **D**, Grupo Preinc 60 días (40x); secciones de pulmón del grupo Preinc, las flechas señalan la presencia de granulomas perfectamente formados, rodeados por una arquitectura alveolar característica, así como el aclaramiento de las zonas de neumonía en el tejido pulmonar.

Reportes de estudios anteriores muestran que, en la fase progresiva de la enfermedad, se producen importantes modificaciones inmunológicas que permiten la supervivencia y proliferación bacteriana, tales como mayor actividad de los linfocitos Th-2 (*con menos actividad de los Th-1*) y macrófagos desactivados que secretan citoquinas supresoras de la inmunidad celular como el TGF. Estas alteraciones inmunológicas permiten que la enfermedad progrese generando extensa consolidación neumónica y muerte por insuficiencia respiratoria (Hernández-Pando y cols, 2004). Sin embargo, interesantemente nuestros resultados muestran una reducción de las áreas neumónicas y un incremento de la formación y maduración de los granulomas, 60 días posteriores a la infección, en los ratones que recibieron el Ac administrado de forma conjunta con la micobacteria por vía intratraqueal. Estos resultados demuestran que el Ac administrado desencadena mecanismos a nivel del ambiente pulmonar, que conducen a la contención de la infección en los granulomas.

Las células B han sido descritas como componentes importantes en la inflamación granulomatosa en la TB pulmonar, con gran cantidad de estos linfocitos agregados como una característica histológica prominente de la infección (González-Juarrero y cols, 2001; Ulrichs y cols, 2004; Tsai y cols, 2006;). La ausencia de células B, donde la inmunidad óptima se ve comprometida y se manifiesta una exacerbada patología pulmonar sobre la infección aguda por *M. tuberculosis*, conduce paradójicamente a la pérdida de la progresión inflamatoria durante la fase crónica de la infección en ratones (Bosio y cols, 2000). Una posible explicación a esta paradoja consiste en que las células B, funcionan de manera dependiente de la fase de infección durante el establecimiento de la TB. Así, durante la infección aguda, las células B son requeridas para una óptima respuesta granulomatosa y una inmunidad efectiva frente al reto pulmonar con *M. tuberculosis*. Contrariamente, su ausencia, altera la regulación de la formación de granulomas,

resultando en un incremento de la inflamación pulmonar como requerimiento para contener la infección. En contraste, durante la fase crónica de la infección, donde los bacilos persistentes son contenidos, las poblaciones de células B inmunológicamente activas promueven la perpetuación de la inmunidad local del hospedero contra *M. tuberculosis* y pueden ayudar en la prevención de la reactivación de la enfermedad. Esta perpetuación de la inflamación puede ocurrir, en parte, debida a que las células B actúan como APC. Todo lo anterior sugiere que las células B actúan optimizando la defensa del hospedero durante la infección aguda y estimulan la respuesta inflamatoria crónica durante la infección persistente (Maglione y Chan, 2009).

Los candidatos vacunales son primero evaluados en ratón y los mejores, son pasados a evaluación en curiel. El curiel desarrolla granulomas similares a los formados en el humano y es muy susceptible a *M. tuberculosis*, con una rápida progresión a la enfermedad activa y una evolución similar a la observada en humanos. Este modelo es de gran importancia para la evaluación de vacunas y según reporta la Comunidad Europea, la efectividad de los candidatos en este biomodelo experimental se mide, no sólo por la determinación de la carga bacilar, sino también por el nivel de sobrevida y por análisis de cambios histopatológicos (McShane y Williams, 2010; Williams y cols, 2005).

Muchas de las vacunas usadas en humanos, (*dígase* inactivadas, vivas atenuadas y de subunidades), proveen protección mediante la estimulación de la respuesta inmune humoral (Robbins y cols, 1996) y la respuesta de Ac es usada como medidor de inmunogenicidad de las vacunas. Algunos ejemplos de vacunas antibacterianas que inducen respuesta de Ac son las vacunas de subunidades de polisacáridos. Estos incluyen la vacuna de *Haemophilus influenzae* tipo B, la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* y la vacuna conjugada de meningococo serogrupo C (Marchant y Kumar, 2002; Trotter y cols, 2002). Estos polisacáridos estimulan respuesta inmune humoral

independiente de células T (Lesinski y Westerink, 2001), mediante la producción de IgM e IgG. Por otro lado, *Salmonella typhi* resulta un modelo interesante de patógeno intracelular facultativo contra el cual la protección es provista por respuesta de Ac, resultante de la inmunización con una vacuna conjugada de polisacárido.

Uno de los principales argumentos en contra del rol de los Acs en la defensa del hospedero contra *M. tuberculosis* ha sido que los patógenos intracelulares no son reconocidos por Acs. Sin embargo, los patógenos intracelulares son encontrados en el espacio extracelular antes de entrar a las células y algunos Acs pueden ejercer y/o mediar efectos biológicos dentro de las células (Glatman-Freedman y Casadevall, 1998). Adicionalmente, ha sido demostrada la relevancia de la IgA mucosal en la protección contra infecciones micobacterianas usando ratones deficientes de IgA y de pIgR. Este estudio demostró que los ratones deficientes fueron más susceptibles a las infecciones micobacterianas en el tracto respiratorio y mostraron una reducción en la producción de factores pro-inflamatorios y protectores tales como IFN- γ y TNF- α en pulmón. Los posibles mecanismos para tratar de explicar la defectuosa respuesta pro-inflamatoria en pulmón de ratones deficientes pudieran involucrar señales defectuosas mediante el receptor Fc o receptores homólogos, lo cual puede conducir a una inadecuada activación de macrófagos en pulmón. Además, esto puede resultar subsecuentemente en una inducción y producción sub-óptimas de citoquinas y quimioquinas importantes para la atracción y migración de células hacia el sitio de infección (Tjarnlund, 2007).

La IgA_{sh} es estructural y funcionalmente liberada por el ambiente mucosal, con la capacidad de neutralizar Ags y virus, promover la aglutinación, facilitar la exclusión de Ags y prevenir la adherencia de patógenos a las superficies del epitelio mucosal (Brandtzaeg, 2009). La capacidad de aglutinar y neutralizar virus de la IgA_p y de la IgA_s es superior al mostrado por la IgA_m (Berdoz y Corthesy, 2004). La IgA_s puede promover la muerte de la

bacteria y de otros Acs de la superficie mucosal debido a sus propiedades mucofílicas por la unión al CS (Phalipon y Corthesy, 2003), debido a que facilita el aclaramiento de los complejos inmunes por movimiento de los cilios respiratorios y la peristalsis intestinal.

La interacción entre la bacteria opsonizada y la membrana fagosomal puede tener influencia negativa en la supervivencia bacteriana, si se considera que la aposición cerrada con la membrana fagosomal es importante para el desarrollo de la capacidad de *M. tuberculosis* de inhibir la maduración fagosomal y la fusión de este con el lisosoma (Reljic y cols, 2006a). Se ha propuesto que la acción de la IgA puede involucrar una serie de mecanismos, entre los cuales se encuentra la ADCC (Tagliabue y cols, 1984) y la estimulación de las APC, requerida para la activación de células T (Arulanandam y cols, 2001).

La infección por TB se transmite por vía mucosal mediante la inhalación de pequeñas gotas dentro de los alveolos pulmonares. Por esta razón, es de esperar que los Acs de tipo IgA, de alta afinidad y producidos por el hospedero infectado, puedan encontrar la infección incipiente en las 2 ó 3 semanas posteriores a la infección. Este tiempo se propone en base a la necesidad de las células B de reactivarse bajo la maduración y cambio de isotipos que ocurre dentro de los centros germinales y la subsecuente transcitosis de la IgA a los sitios mucosales, conteniendo así la infección. Al mismo tiempo, la multiplicación bacilar ocurre y la mayoría de los bacilos muy probablemente permanezcan en el ambiente intracelular, generalmente, dentro de macrófagos infectados, evadiendo así la acción de la IgA. Esto puede constituir, en parte, la explicación para la pérdida de evidencias acerca del rol protector que puede desempeñar la IgA durante la infección primaria por TB, tanto en humanos como en modelos experimentales. Por otro lado, los niveles de Ac IgA han sido asociados con la protección contra la lepra (Cree y cols, 1988). La vacunación con BCG también induce una respuesta sustancial de IgA y se

ha reportado que ratones deficientes de IgA son menos capaces de controlar la infección por BCG, a pesar de la parcial compensación por el incremento de la respuesta IgM específica (Rodríguez y cols, 2005). LAM aparece como el mayor blanco antigénico para la respuesta de IgA, seguido de la vacunación oral con BCG (Brown y cols, 2003), sin embargo, el papel protector de la IgA inducida por el BCG en la protección contra *M. tuberculosis*, no se conoce a profundidad.

En nuestro caso, la IgAsh mostró capacidad protectora por si sola mediante reducción del área neumónica y al ser administrada de forma preincubada con la micobacteria, mediante reducción de la carga bacteriana y del área neumónica, asociado a la formación de granulomas numerosos y organizados. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que el efecto protector de la IgA no se basa sólo en su interacción con el receptor CD89 (FcαR1), sino que deben existir otros receptores no descritos aun y mecanismos no dependientes de especie que estimulen la eliminación de la micobacteria quizás por el mecanismo de exclusión inmune. Evidentemente, a pesar de la distancia entre las especies de ratón y el humano, existe algún mecanismo que sobrepasa esta barrera y que aun no está descrito. El ejemplo más evidente de reconocimiento de anticuerpos murinos en el humano es el uso de AcM obtenidos en ratón y empleados en el humano para el tratamiento de rechazo de órganos. Tal es el caso del OKT-3, un AcM producido en ratón de isotipo IgG2a que reconoce la molécula CD3 que se encuentra en la superficie de linfocitos T y que es usado como droga inmunosupresora en el trasplante de órganos, tanto para prevenir el rechazo en pacientes de alto riesgo como para tratar el rechazo grave resistente al tratamiento habitual (Schroeder y cols, 1994).

IV.4.3 Determinación de la expresión, en pulmón, de los genes IFN- γ , TNF- α , iNOS e IL-4, en ratones Balb/c

IV.4.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Con el objetivo de determinar la expresión de citoquinas en los pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis*, evaluamos la presencia de estas moléculas en pulmón mediante PCR en tiempo real. En este caso se evaluó la expresión de iNOS, TNF- α , IFN- γ e IL-4.

Todos los grupos mostraron una expresión basal de las citoquinas estudiadas durante los primeros 7 días después de la infección con *M. tuberculosis* (**Fig.17**). Sin embargo, a los 30 días posteriores a la infección, los ratones que recibieron *M. tuberculosis* preincubado con la IgAsh mostraron una expresión estadísticamente significativa de iNOS, con respecto a la expresión de esta citoquina en pulmón de los ratones del grupo NT y los que recibieron la IgAsh antes de la infección con la micobacteria (**Fig.17A**).

En la evaluación de la expresión de IFN, TNF e IL-4 no se observaron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los intervalos de tiempo evaluados, sin embargo, es evidente la tendencia al aumento en la expresión de TNF 30 días después de la infección con *M. tuberculosis*, en el grupo que recibió la IgAsh preincubada con la micobacteria. En contraste, esta tendencia se ve reflejada en el grupo que recibió la IgAsh previo a la infección con la micobacteria, 30 días después del reto con *M. tuberculosis*, para IFN e IL-4.

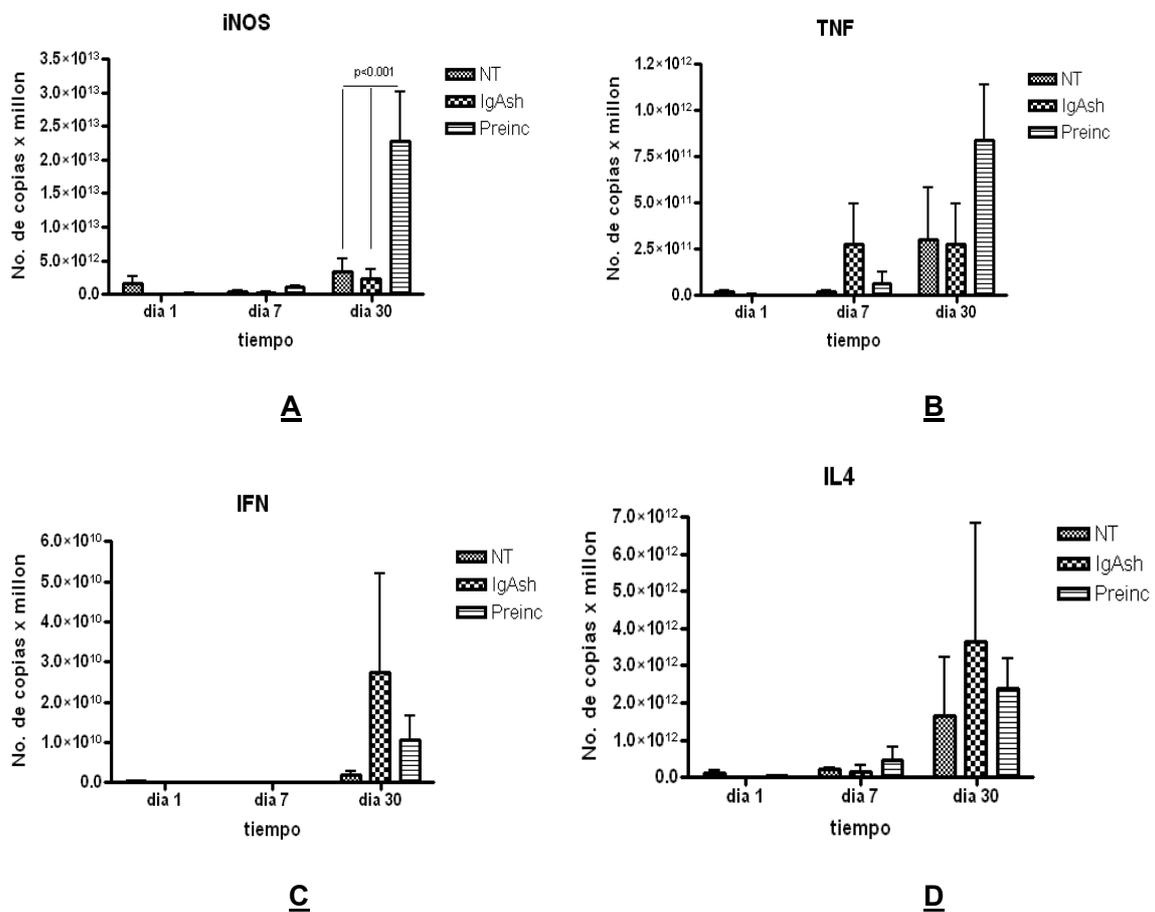


FIGURA 17. Análisis de la expresión de citoquinas mediante PCR en tiempo real. Se evalúan células de pulmón aisladas de ratón Balb/c a los días 1, 7 y 30, después de la infección con *M. tuberculosis* H37Rv por vía intratraqueal. Los datos fueron procesados empleando el Software GraphPad Prism 4. **A**, iNOS; **B**, TNF- α ; **C**, IFN- γ ; **D**, IL4.

Se muestran la media y desviaciones estándar de tres mediciones de dos experimentos independientes ($n=5$ cada uno). Las diferencias entre la medias se evaluaron mediante ANOVA de clasificación doble y la prueba de Tukey.

La expresión de iNOS ocurre como consecuencia de la activación de macrófagos y para que ocurra dicha activación es necesaria la fusión del fagosoma con el lisosoma dentro del macrófago alveolar. Al parecer, en este caso la IgAsh del grupo preincubado debe estar recubriendo la superficie de la micobacteria y favoreciendo la entrada de esta al macrófago, mediante una ruta donde si se favorece la fusión del fagosoma y el lisosoma, similar al mecanismo propuesto por Reljic y cols 2006. En contraste, en el grupo NT y el

grupo IgAsh no se obtuvo expresión significativa de iNOS. Estos resultados sugieren que la activación de los macrófagos en estos grupos fue más tardía, como ocurre durante la infección natural, donde la micobacteria es reconocida por receptor de complemento y principalmente por receptor de manosa, a través de los cuales la micobacteria logra interferir sobre la fusión fago-lisosomal y en consecuencia replicarse y persistir intracelularmente (Pasquinelli, 2008).

Los macrófagos murinos ejercen un potente rol antimicobacteriano mediante la producción de ON bajo la acción de la isoforma inducible de la enzima iNOS y en respuesta a moléculas derivadas de patógenos. La producción de ON es regulada por el balance entre citoquinas de tipo Th1 estimuladoras (INF- γ , IL-1B y TNF- α) y citoquinas de tipo Th2 inhibitorias (IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β) (Yang y cols, 2009). Si el balance entre las citoquinas estimuladoras e inhibitorias se pierde, la producción de ON en respuesta a las infecciones por micobacterias puede ser inadecuadamente alta o baja y resultar en la diseminación del daño tisular o en la no capacidad de aclarar la infección (Yang y cols, 2009).

La iNOS genera la producción de ON, el cual reacciona con los radicales libres de oxígeno que también son producidos en gran cantidad y al mismo tiempo induce la producción de peroxinitrilos, compuestos muy inestables que se asocian rápidamente a diferentes constituyentes bioquímicos celulares y entre estos uno de los blancos principales son las proteínas (*en particular el aminoácido tirosina*) (Kwon, 1998). Como consecuencia de esta asociación, las proteínas nitrosiladas experimentan cambios conformacionales con pérdida irreversible de sus funciones, lo cual contribuye a la muerte celular, asociada con alteraciones de la arquitectura del sistema vesicular en las células del hospedero (Hernández-Pando y cols, 2001).

El papel protector de los intermediarios reactivos del nitrógeno contra la infección por *M.*

tuberculosis ha sido bien establecido en diferentes modelos de TB experimental en ratón, empleando cepas de laboratorio. Scanga y colaboradores demostraron que ratones deficientes de iNOS son mucho más susceptibles que los ratones de no deficientes, a los diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*, observándose que el nivel de replicación de la micobacteria en los órganos fue superior en los ratones deficientes. Esto refuerza el hecho de que los intermediarios reactivos del nitrógeno son requeridos para el control de la infección por *M. tuberculosis* en el modelo murino, al ser retados tanto por vía endovenosa como por vía aerógena (Scanga y cols, 2001).

Shah y Nathan reportaron que ratones mutantes con pérdida de los genes que codifican para IFN- γ e iNOS, sufren manifestaciones de TB exacerbadas. Estos mutantes fallaron en el control del crecimiento de cepas virulentas de *M. tuberculosis* en pulmón, trayendo como resultado la muerte en las 2-4 semanas posteriores a la infección (Shah y Nathan, 1997). Estos hallazgos *in vivo* son consistentes con estudios *in vitro* que sugieren un rol central de iNOS en el control de la TB (Flesch y Kaufmann, 1991).

Otro estudio evaluó el papel del ON en el control de la infección por *M. tuberculosis* en pulmón, mediante el uso de bajas dosis de infección por aerosol en el modelo de ratón. Los autores demostraron que aunque el IFN- γ es imprescindible en el control temprano del crecimiento micobacteriano en pulmón, este control no es completamente dependiente de la expresión del gen iNOS. La ausencia de iNOS en pulmón, sin embargo, resultó en un incremento de células polimorfonucleares y necrosis eventual en los granulomas pulmonares de los ratones infectados y carentes del gen de iNOS2 (Cooper y cols, 2000). Un estudio más reciente reportó que ratones *knockout* para el gen de iNOS e infectados con *M. tuberculosis*, desarrollaron serias manifestaciones clínicas y lesiones granulomatosas conteniendo bacilos en las meninges, lo cual estuvo ausente en los ratones no deficientes (Olin y cols, 2008).

Diferentes estudios ejemplifican las causas de la inhibición de iNOS en MA humanos, lo cual se traduce en una actividad antimicrobacteriana reducida (Nozaki y cols, 1997). Este efecto se ha visto en pacientes con TB activa que exhalan abundante ON (Wang y cols, 1998) y en la detección de células productoras de ON en biopsias de granulomas de pacientes con TB (Schon y cols, 2004).

IV.4.4 Determinación de la expresión de citoquinas en subpoblaciones linfocitarias de interés, en pulmón de ratones Balb/c.

IV.4.4.1 Citometría de flujo

Los pulmones de los ratones, tanto del grupo NT que recibió SS, como de los grupos IgAsh y Preinc, mostraron niveles basales de células CD4 y CD8 que expresan IFN- γ (**Fig.18A y B**), así como de células CD11 expresando TNF- α (**Fig.18C**), y células CD11/CD86 expresando IL12 (**Fig.18D**), desde 1 y hasta 60 días después de la infección con la micobacteria.

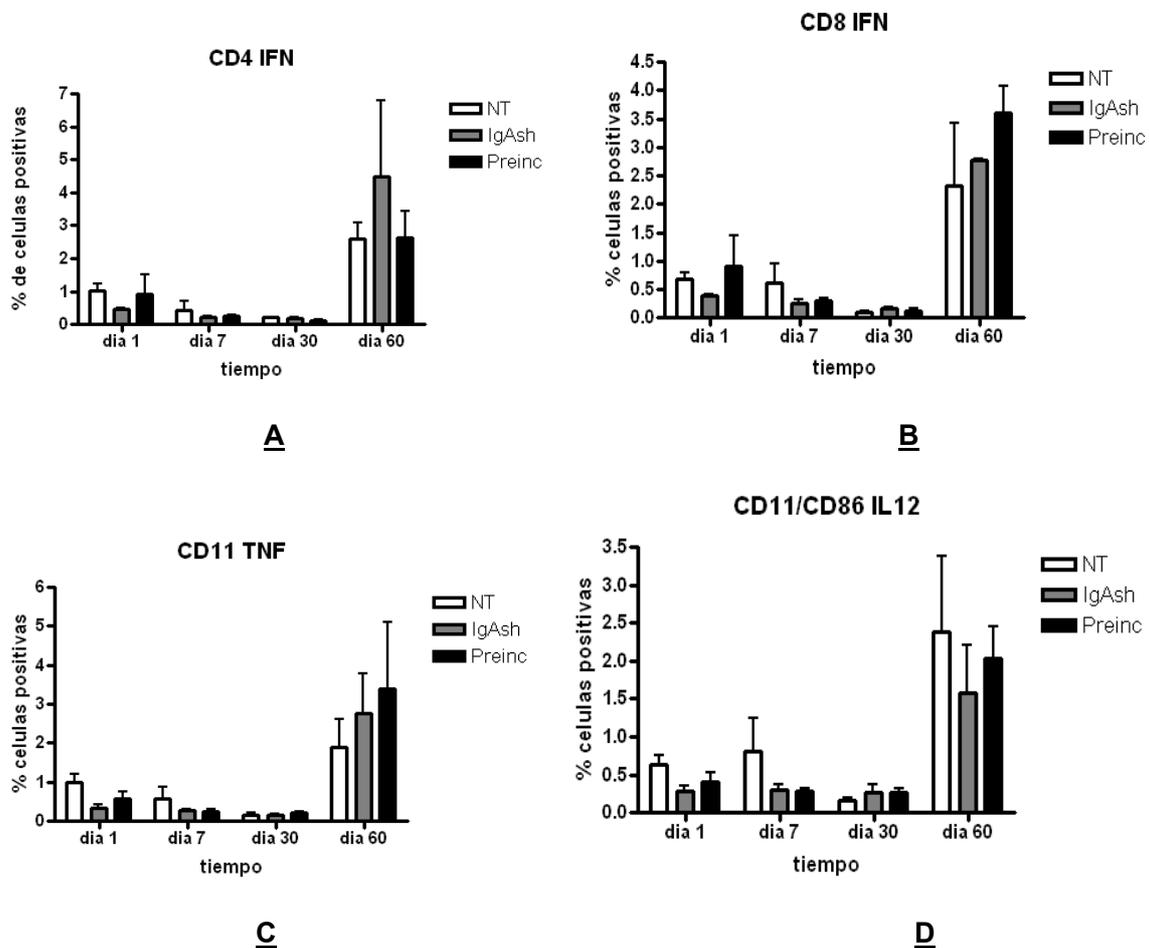


FIGURA 18. Análisis de la expresión de citoquinas, mediante citometría de flujo. Se evalúan células de pulmón aisladas de ratón Balb/c a los días 1, 7, 30 y 60, después de la infección con *M. tuberculosis* H37Rv por vía intratraqueal. Los datos fueron procesados empleando el Software GraphPad Prisma 4. **A**, CD4 IFN- γ ; **B**, CD8 IFN- γ ; **C**, CD11 TNF- α ; **D**, CD11/CD86 IL12. Se muestran la media y desviaciones estándar de tres mediciones de dos experimentos independientes ($n=5$ cada uno). Las diferencias entre la medias se evaluaron mediante ANOVA de clasificación doble y la prueba de Tukey.

El hecho de que no se hayan encontrado niveles significativos de expresión de células marcadas con ninguna de las citoquinas en estudio, puede deberse a que en nuestro estudio se están midiendo dos efectos solapados, la administración de la IgAsh y la infección con *M. tuberculosis*, porque todos los animales, incluyendo los del grupo NT, fueron retados con la micobacteria. Por tal razón, el poder de discriminación no es muy

bueno, ya que todos los animales tienen una respuesta de base ante la infección con este patógeno.

Adicionalmente, está demostrado que en la TB no existe correlato de protección. Numerosos estudios avalan esta afirmación y entre ellos el trabajo desarrollado por Mittrucker y cols, quienes demostraron que la producción de IFN- γ en el sitio de infección no correlaciona con la protección contra *M. tuberculosis*, sugiriendo que la expresión de citoquina en algunos casos puede ser un marcador de magnitud de la respuesta inflamatoria (Mittrucker y cols, 2007). Años más tarde se llevó a cabo un estudio clínico donde los resultados indicaron que pacientes con TB tuvieron una elevada respuesta de células TCD4⁺ polifuncionales luego de estimulación toda la noche de sangre con ESAT-6 y PPD, comparado con individuos sanos que presentaban prueba de tuberculina positiva (Sutherland y cols, 2009). Y recientemente, otro estudio confirmó que la frecuencia y el perfil de citoquinas de células T específico a micobacteria no correlaciona con la protección con TB, indicando que los componentes críticos de la inmunidad contra *M. tuberculosis*, tal como la producción de IFN- γ por células TCD4⁺ no necesariamente se traduce en correlato inmune de protección contra la enfermedad (Kagina y cols, 2010)

Existen varias razones por las cuales numerosos estudios han medido la producción de IFN- γ , y es fundamentalmente debido a que esta citoquina juega un rol clave en la activación de macrófagos en pulmón. En ratones donde ha sido delecionado el gen de IFN- γ , se demostró que estos son más susceptibles a la infección con *M. tuberculosis* (Cooper y cols, 1993; Flynn y cols, 1993; Flynn y Chan, 2003). El IFN- γ puede activar macrófagos y estos desarrollar mecanismos bactericidas, produciendo grandes cantidades de radicales libres de oxígeno y nitrógeno (O'Brien y cols, 1996; Kaufmann, 2002; Orme, 2003).

TNF- α es una citoquina prototípica inflamatoria que contribuye significativamente al

desarrollo e inmunopatología en varios estadios de la TB. En un estudio previo, donde se usaron dosis bajas de *M. tuberculosis* para infectar ratones por vía aerogénica, se analizó el efecto de la neutralización de TNF en la progresión de la enfermedad durante la TB crónica. Los resultados mostraron que la neutralización del TNF conlleva a una marcada desorganización en la formación de los granulomas (Chakravarty y cols, 2008). El TNF es una citoquina cuyas funciones biológicas fundamentales incluyen la regulación del tráfico de células (Sedgwick y cols, 2000) y la respuesta granulomatosa de la micobacteria (Algood y cols, 2004; Algood y cols, 2005), jugando un papel esencial en el control de la TB en las fases aguda y crónica, así como en la infección por *M. bovis* BCG en ratones (Scanga y cols, 1999). Previamente ha sido demostrado que la neutralización de TNF en la fase crónica de la infección tuberculosa resulta en cambios histopatológicos indicativos de inflamación en el pulmón de ratones infectados, asociado al incremento de la celularidad, metaplasia escamosa y desorden en la formación del granuloma, sugiriendo que esta citoquina posee un efecto anti-inflamatorio (Sedgwick y cols, 2000).

Debido a que los granulomas producidos en la segunda y tercera semana post-infección están constituidos predominantemente por células Th-1 y hay una elevada producción de IFN- γ que activa a los macrófagos, estimulándolos a producir gran cantidad de iNOS, se ha demostrado que los MA y los linfocitos Th-1 son los principales elementos inmunológicos que protegen al hospedero en contra del bacilo tuberculoso (Zganiacz y cols, 2004). La segunda etapa de la enfermedad en este modelo experimental corresponde a la fase avanzada o progresiva, la cual se caracteriza por un incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones, así como de áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial, que en conjunto conducen a la muerte (Soler y cols, 1999). Desde el punto de vista inmunológico,

durante esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2) (Wang y cols, 1999), los cuales se caracterizan por producir IL 4, 5, 6, 10 y 13.

IL-4, al igual que la IL-10 y la IL-13, es un eficiente antagonista de las células Th-1. En consecuencia, la emergencia de los linfocitos Th-2 durante la fase progresiva de la enfermedad puede contrarrestar la actividad protectora de las células Th-1 y desviar la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral (Wang y cols, 1999).

Los MA son las primeras células que se infectan ante la presencia de *M. tuberculosis* y son capaces de producir cantidades significativas de citoquinas tipo 1 incluyendo IL12, IFN- γ y TNF- α (Wang y cols, 1999). Las citoquinas producidas por los MA tales como IL12 e IFN- γ , pueden ayudar a la producción de metabolitos reactivos con propiedades antimicobacterianas tales como el ON (Xing y cols, 2000). Los bacilos de *M. tuberculosis* tienen la capacidad de prevenir la fusión fago-lisosomal y tomar lugar dentro de los MA. Estudios previos han demostrado que los MA pueden ser estimulados por la micobacteria para producir IL12, IFN- γ y TNF- α , los cuales pueden conducir a la activación y producción de metabolitos reactivos del nitrógeno tales como el ON (Wang y cols, 1999; Xing y cols, 2000). Adicionalmente, los MA son componentes celulares críticos del granuloma y pueden jugar un importante papel como inmuno-reguladores en la inmunidad de tipo 1. Relacionado con lo anterior, se ha propuesto que uno de estos mecanismos reguladores está mediado por la expresión de TNF- α producido por dichos macrófagos (Zganiacz y cols, 2004). Sin embargo, se cree que los MA son potentes APC y esto sugiere su rol directo en la activación de células T naive específicas a *M. tuberculosis* (Soler y cols, 1999).

Diversos estudios han mostrado la asociación entre la producción de Acs y citoquinas en

la protección contra patógenos intracelulares. Los datos acumulados sugieren que las dos ramas del sistema inmune, (*respuesta inmune humoral y celular*), pueden interactuar y de esta forma, afectar el curso de la infección por *M. tuberculosis*. En un modelo diferente de infección, el efecto del AcM TBA61 fue extendido por adición de IFN- γ , ambos administrados intranasalmente (Reljic y cols, 2006b). En ese estudio, el tratamiento con IFN- γ 3 días después al tiempo de la infección, así como 2 y 7 días después del reto con *M. tuberculosis* por vía aerosol, resultó en una extensión del efecto del AcM de IgA en términos de reducción de las UFC, perdurando hasta 4 semanas y con disminución en la infiltración granulomatosa en pulmón en los ratones.

Recientemente se demostró que la depleción de citoquina IL-4 en ratones *knockout* para el gen de esta citoquina por Ac neutralizantes reduce el grado de la infección por *M. tuberculosis* manifestado por disminución de las UFC (Buccheri y cols, 2007). Por otra parte, la administración del AcM TBA61 y el IFN- γ recombinante por vía intranasal resultó en una notable reducción de las UFC (Reljic y cols, 2006b). Se conoce que la reconstitución de IL-4, revierte el efecto de la reducción de las UFC y en términos de efecto benéfico del AcM de IgA e IFN- γ (Buccheri y cols, 2007). Además, la inmunoterapia combinada consistente en la administración intranasal de IFN- γ , AcM TBA61 y AcP anti IL-4 intravenoso, previenen la recaída de la enfermedad en ratones infectados con *M. tuberculosis* y tratados con isoniazida y rifampicina por 4 semanas (*comenzando 2 semanas antes de la infección*). Este efecto protector fue demostrado en varias cepas de ratón (Buccheri y cols, 2009).

No todos los isotipos de Acs están involucrados en la activación de Th1 mediante el FcR. Sólo IgG2a e IgA, asociados a la inmunidad mediada por células, pueden potenciar este tipo de respuesta (Moore y cols, 2002; Moore y cols, 2003). Resultados previos relacionados con el hecho de que la IgA y las CD están involucradas en la activación de

células T mediante el FcR, demostraron que el FcR α (CD89) funcional es expresado en las CD mucosales y su unión cruzada indujo internalización del receptor y secreción de citoquinas (Geissmann y cols, 2001). Esto sugiere un rol significativo en la detección y presentación de Ags en el epitelio mucosal que incrementa la activación de células T. Además, el requerimiento de IgA para el control de la influenza en ratones es también relacionado con el manejo de Ags y la presentación para la activación de células T (Geissmann y cols, 2001). La internalización de Ags mediante el FcR de CD es más eficientemente presentado por el MHC para la activación de células T CD4 y CD8 que los Ags internalizados en la fase fluido (Regnault y cols, 1999).

Los resultados obtenidos con este trabajo soportan el creciente interés en evaluar el rol de los Acs en el control de las infecciones micobacterianas intracelulares y particularmente, explorar la protección que puede conferir el isotipo IgA en este sentido.

Basado en la capacidad protectora demostrada en este modelo experimental por la IgAsh frente a la infección con *M. tuberculosis*, resulta interesante evaluar un esquema de reto similar en ratones desnudos, teniendo en cuenta que dicho biomodelo consiste en ratones inmunocomprometidos que carecen de un timo funcional y sería ideal para estudiar el mecanismo mediante el cual el Ac ejerce su efecto protector. Los ratones desnudos tienen un complemento normal de linfocitos B dependientes de la medula ósea y por lo tanto, son considerados una herramienta excelente para estudiar las funciones de las células B (Carbone y Maschi, 2006).

Adicionalmente, sería de gran utilidad estudiar el efecto terapéutico de la IgAsh frente a la infección con *M. tuberculosis*. En la actualidad la terapia antituberculosa está muy lejos de ser la ideal porque requiere de la combinación de múltiples drogas y su administración por prolongados períodos de tiempo (Roy y cols, 2007). Otro elemento importante consiste en el hecho de que la terapia aplicada en estos momentos sólo tiene éxito en eliminar las

bacterias activamente replicativas, sin embargo, las poblaciones de bacilos latentes o de ciclos replicativos lentos requieren terapias de mayor duración (Grange, 1992). A pesar del dogma existente sobre el papel que pueden desempeñar los anticuerpos se ha visto que estas moléculas pueden jugar un papel protector frente a la infección con *M. tuberculosis* así como tener acceso a la bacteria en diferentes situaciones (*durante la infección inicial, dentro de los granulomas tempranos donde la bacteria puede ser localizada en el espacio extracelular y durante la muerte de las células infectadas*). Aunque en nuestro trabajo se demuestra el efecto profiláctico de la IgAsh frente a la infección con *M. tuberculosis*, no se puede descartar que la IgAsh tenga efecto terapéutico después de observar el efecto sobre la expresión de iNOS y la formación de granulomas. Quizás el elemento de mayor importancia en la evaluación del efecto terapéutico de la IgAsh frente a la infección con *M. tuberculosis* pudiera ser su aplicación de forma conjunta con el tratamiento convencional y sobre todo, en caso de cepas MDR. No obstante no se puede obviar la posibilidad de su uso en la TB latente, de lo cual hay algunos resultados de nuestro laboratorio con el uso de AcM de tipo IgA contra la proteína 16 kDa de *M. tuberculosis* donde se observó protección (*resultados no publicados*). Adicionalmente, otra aplicación importante puede ser el desarrollo de vacunas que estimulen la producción de Ac de tipo secretor que puedan proteger frente a la TB.

Nuestros resultados demuestran, por primera vez, el efecto profiláctico de la administración intranasal de la IgAs obtenida de calostro humano, en un modelo de infección intratraqueal con *M. tuberculosis* en ratón Balb/c. Además, se demuestra por primera vez, que la incubación previa de *M. tuberculosis* con IgAsh puede inhibir el potencial infectivo de la micobacteria.

V. CONCLUSIONES

1. La combinación de cromatografía de intercambio aniónico y exclusión molecular en gel filtración es una estrategia adecuada para la obtención de IgA de tipo secretora a partir de calostro humano.
2. La IgAsh contenida en el calostro es capaz de reconocer antígenos de *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*, lo cual puede deberse fundamentalmente a la vacunación con BCG y a la exposición a *M. tuberculosis* y micobacterias ambientales.
3. La IgAsh permanece en fluidos biológicos de ratón Balb/c varias horas después de su administración por vía intranasal, lo cual puede estar relacionado con la presencia del componente secretor en su estructura.
4. La administración por vía intranasal de IgAsh mostró evidencias de protección en el modelo de infección intratraqueal con *M. tuberculosis* en ratón Balb/c, basado en una reducción significativa del área neumónica en el tejido pulmonar.
5. La IgAsh induce un efecto protector, cuando es preincubada con *M. tuberculosis* previo a su administración por vía intratraqueal a ratones, lo cual se evidenció en la disminución de la carga bacteriana, del área neumónica y en el aumento de la expresión de iNOS en el tejido pulmonar.

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar los estudios del patrón de reconocimiento de la IgAsh contra antígenos y epitopes de *M. tuberculosis*.
2. Evaluar la capacidad protectora de la IgAsh frente a la infección por *M. tuberculosis*, al ser administrada por vía intranasal a ratones desnudos.
3. Evaluar otros esquemas de administración (dosis y cantidad de inóculo) que permitan continuar el estudio de los posibles mecanismos mediante los cuales la IgAsh ejerce un efecto protector frente a la infección por *M. tuberculosis* en pulmón.
4. Evaluar la capacidad protectora de la coadministración de formulaciones de IgAsh e IgGh, frente a la infección experimental con *M. tuberculosis* en ratón Balb/c.
5. Evaluar el potencial terapéutico de la administración intranasal de la IgAsh, frente a la infección con *M. tuberculosis* en el modelo de ratón.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acosta A, Falero G, León A, López Y, Cádiz A, Infante JF et al. 2003. A new approach for the study of defense mechanism against tuberculosis. Role of the specific antibodies. *Biotechnología Aplicada* 20 (2):130-134.

Acosta A, Norazmi MN and Maria E. Sarmiento. 2010. Antibody mediated immunity-a missed opportunity in the fight against tuberculosis? *Malasyan J Med Sci* 17(2):66-67.

Aderem A and Underhill D.M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593-623.

Algood HM, Lin PL, Yankura D, Jones A, Chan J and Flynn JL. 2004. TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b cells in vivo during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 172:6846–6857.

Algood HM, Lin PL and Flynn JL. 2005. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 41(3):189–193.

Anuario Estadístico de Salud 2008. Ministerio de Salud Pública, Cuba. Incidencia y Prevalencia de Tuberculosis. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud, MINSAP.

Anuario estadístico de salud. 2009. Ministerio de salud pública. Dirección nacional de registros médicos y estadísticas de salud. Cuba.

Aquilina S and Winkelman T. 2008. Tuberculosis: A Breast-Feeding Challenge. *Journal of Perinatal & Neonatal Nursing.* 22(3):205-213.

Armstrong JA and Hart PD.1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. *J Exp Med* 142:1–16.

Arulanandam BP, Raeder RH, Nedrud JG, Bucher DJ, Le J, Metzger DW. 2001. IgA immunodeficiency leads to inadequate Th cell priming and increased susceptibility to influenza virus infection. *J Immunol* 166:226-231.

Bach JF. 1982. Secretory immunoglobulin A. In: Bach JF. *Immunology.* New York: John Wiley & Sons Incl; p. 334.

Balint J, Ikeda Y, Nagai T, Terman DS. 1982. Isolation of Human IgA Utilizing Protein A by Affinity Chromatography. *Immunological Investigations* 11:283-290.

Balu S, Reljic R, Lewis MJ, Pleass RJ, McIntosh R, van Kooten C et al. 2011. A novel human IgA monoclonal antibody protects against Tuberculosis. *The Journal of Immunology* 186(5):3113-3119.b

Barrera L. 2007. Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. En: Palomino JC, Leáo SC and Ritacco V (eds). *Tuberculosis. From basic science to patient care.* 1st edition 93-111.

Bates JH and Stead WW. 1993. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin N Am* 77: 1205-1217.

Beatty WL, Rhoades ER, Hsu DK, Liu FT, Russell DG. 2002. Association of a macrophage galactoside-binding protein with *Mycobacterium*-containing phagosomes. *Cell Microbiol* 4:167–176.

Beetham PK, Glick KB, Dick JW. 1993. A comparison of three isolation methods for obtaining immunoglobulin A from Turkey bile. *Avian diseases* 37:1026-1031.

Bennett RH and Jasper DE. University of California, Davis, Unpublished data 1977.

Berdoz J and Corthesy B. 2004. Human polymeric IgA is superior to IgG and single-chain Fv of the same monoclonal specificity to inhibit urease activity associated with *Helicobacter pylori*. *Mol Immunol*. 41:1013-1022.

Bermudez L, Goodman J and Kanetsuna F. 1980. Effect of lysozyme on mycobacteria. *Microbiol Immunol*, 24:1151–1162.

Berrington WR and Hawn TR. 2007. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 219:167-186.

Biesbrock AR, Reddy MS and Levine MJ. 1991. Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. *Infect. Immun.* 59:3492-3497.

Birkhoff M, Leitz M, Marx D. 2009. Advantages of intranasal vaccination and considerations on device selection. *Indian J Pharm Sci* 71(6):729-731.

Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C et al. 1998. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 9:277–287.

Bonner A, Almogren A, Furtado PB, Kerr MA and Perkins SJ. 2009. The Nonplanar Secretory IgA2 and Near Planar Secretory IgA1 Solution Structures Rationalize Their Different Mucosal Immune Responses. *The Journal of Biological Chemistry* 284:5077-5087.

Bosio CM, Gardner D and Elkins KL. 2000. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol*. 164: 6417–6425.

Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A. 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 70:672–678.

Brandtzaeg P, Halstensen TS, Huitfeldt HS, Krajci K, Kvale D, Scott H et al. 1992. Epithelial expression of HLA, secretory component (poly-Ig receptor), and adhesion molecules in the human alimentary tract. *Ann NY Acad Sci* 664:157-179.

Brandtzaeg P. 2003. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* 21:3382-3388.

Brandtzaeg P. 2003a. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 293:3-15.

Brigl M and Brenner MB. 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol.* 22:817-890.

Brown RM, Cruz O, Brennan M, Gennaro ML, Schlesinger L, Skeiky YA et al. 2003. Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin A responses induced by mucosal bacille Calmette-Guerin vaccination. *J Infect Dis* 187:513-517.

Braathen R, Sørensen V, Brandtzaeg P, Sandlie I, Johansen FE. 2002. The carboxyl-terminal domains of IgA and IgM direct isotype-specific polymerisation and interaction with the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* 277:42755-42762.

Buccheri S, Reljic R, Caccamo N, Ivanyi J, Singh M, Salerno A et al. 2007. IL-4 depletion enhances host resistance and passive IgA protection against tuberculosis infection in BALB/c mice. *Eur J Immunol*, 37:729-737.

Buccheri S, Reljic R, Caccamo N, Meraviglia S, Ivanyi J, Salerno A et al. 2009. Prevention of the post-chemotherapy relapse of tuberculous infection by combined immunotherapy. *Tuberculosis* 89: 91-94.

Burnette WN. 1980. Western blotting electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel to a modified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radiolabeled protein. *A. Anal. Biochem.* 112:192-200.

Butler JE. 1974. Immunoglobulins of the Mammary Secretions. In: *Advanced dairy chemistry-1: Proteins*, Larson B.L. Smith (Eds.). Academic Press, New York.

Butler JE and Kehrl ME Jr. 2005. Immunoglobulins and immunocytes in the mammary gland and its secretions. In: *Mucosal Immunology*, 3rd ed.; Mestecky, J., Lamm, M., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., Mayer, L., Eds.; Elsevier Academic Press: Burlington, MA, USA, vol 2:1764-1793.

Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodriguez JC, Garcia I, Cabrera P et al. 2001. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med.* 164:1165-1170.

Caminero JA. 2008. *Guía de la Tuberculosis para Médicos especialistas*. Unión internacional para la Tuberculosis y enfermedades respiratorias. UICTER. 1ra ed. Francia. Febr.

Cardona PJ, Asensio JG, Arbues A, Otal I, Lafoz C, Gil O et al. 2009. Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine SO2 based on phoP mutant. *Vaccine* 27:2499-2505.

Carbone C and Maschi F. 2006. El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de

immunodeficiencia. Revista QuímicaViva 1:19-23.

Cavalcane S, Kritski AL, Ferreira MA, Souza MA, Laszlo A, Wernecj-Barrosdo EB et al. 1997. Association between an early humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens and later development of tuberculosis in human immunodeficiency virus-infected individuals. Int J tuberc Lung Dis 1:170-174.

Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC, Mohan UP, Marino S, Kirshner DE et al. 2008. Tumor necrosis factor blockade in chronic murine TB enhances granulomatous inflammation and desorganizes granulomas in the lungs. Infection and Immunity 76(3):916-926.

Chambers MA, Whelan AO, Lloyd K, Jahans K, Glatman-Freedman A and Hewinson RG. 2000. A monoclonal antibody to MPB83 protects mice from lethal infection with *Mycobacterium bovis*. Third International Conference on *Mycobacterium bovis*, St. John's College, Cambridge, August 14-16.

Chintalacharuvu KR, Yu LJ, Bholra N, Kobayashi K, Fernandez CZ, Morrison SL. 2002. Cuysteine residues required for the attachment of the light chain in human IgA2. J Immunol 169:5072-5077.

Chodiker NB and Tomasi TB. 1963. Gamma-globulins: quantitative relation-ships in human serum and nonvascular fluids. Science 142:1080-1081.

Conley ME and Delacroix DL. 1987. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? Ann Intern Med 107:892-899.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon- γ gene-disrupted mice. J Exp Immunol 178:2243-2247.

Cooper AM, Pearl JE, Brooks JV, Ehlers S, Orme IM. 2000. Expression of the nitric oxide synthase 2 gen is not essential for early control of *Mycobacterium tuberculosis* in the murine lung. Infection and Immunity 68(12):6879-6882.

Cortegano I, Pozo V, Cardaba B, Arrieta I, Gallardo S, Rojo M et al. 2000. Interaction between galectin-3 and Fc γ R2B induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence IL-5REIII. Glycobiology 10:237-242.

Corthesy B and Spertin F. 1999. Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. Biol Chem 380(11):1251-1262.

Coughlan SG, Harkiss D and Hopkins J. 1996. Enhanced proliferation of CD4+ T cells induced by dendritic cells following antigen uptake in the presence of specific antibody. Vet Immunol Immunopathol. 49(4):321-30.

Cree IA, Sharpe S, Sturrock NDC, Cochran IH, Dawlako EC, Smith WCS et al. 1988. Mucosal immunity to mycobacteria in leprosy patients and their contacts. Leprosy Rev 59:309-316.

Crottet P and Corthésy B. 1998. Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab'): A possible implication for mucosal defense. J

Immunol. 161:5445–5453.

Dann M. 2007. Lactation Management. Buffalo, NY: Zinger Publisher.

Dascher CC, Hiromatsu K, Naylor JW, Brauer PP, Brown KA, Storey JR et al. 1999. Conservation of a CD1 multigene family in the guinea pig. *J. Immunol.* 163, 5478–5488.

Dascher CC and Brenner MB. 2005. CD1 and tuberculosis. in *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus* (eds. Cole, S.T., Eisenach, K.D., McMurray, D.N. & Jacobs, W.R., Jr.) 475–487 (ASM Press, Washington, DC).

De la Parte-Pérez M, Hurtado MP y Rivera M. 2001. Tuberculosis en el Nuevo Milenio. *RFM* 24(2):104-119.

de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun* 73:6711-6720.

Derrick SC, Evering TH, Sambandamurthy VK, Jalapathy KV, Hsu T, Chen B et al. 2007. Characterization of the protective T-cell response generated in CD4-deficient mice by a live attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine. *Immunology* 120:192-206.

Dhodapkar KM, Kaufman JL, Ehlers M, Banerjee DK, Bonvini E, Koenig S et al. 2005. Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2910-2915.

Dobos KM, Swiderek K, Khoo KH, Brennan PJ, Belisle JT. 1995. Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63:2846-2853.

Doherty TM and Ardite M. 2004. TB, or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? *J Clin Invest.* 12:1699-1703.

Douglas BY, Mark DP, Duncan K and Clifton EB. 2008. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J. Clin. Invest* 118:1255-1265.

Dromer F, Contrepois A, Brion N, Klein C, Carbon C. 1985. Effects of urinary pH on renal interactions between probenecid and cefsulodin in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 27(4):660-662.

Dzhikidze EK, Stashevich ZK, Salamantora SA. 1988. Stimulation of the secretory IgA system in monkeys by parenteral immunization with a ribosomal sonne dysenteric vaccine. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol* 9:66-70.

Edebo L, Richardson N, Feinstein A. 1985. The effects of binding mouse IgA to dinitrophenylated *Salmonella typhimurium* on physicochemical properties and interaction with phagocytic cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 78(4):353-357.

EEC Council Directive 86/609. 1987. Guide for the care and use of laboratory animals.

Elkon KB. 1984. Isoelectric focusing of human IgA and secretory proteins using thin layer agarose gels and nitrocellulose capillary blotting. *Journal of Immunological Methods* 66:313-321.

Etxeberria F, Romero WM, Herrasti L. 2000. Cifosis angular de la columna vertebral: Identificación del mal de Pott en una momia guane prehispánica de Colombia. *Chungará (Arica)*32(1):41-48.

Falero-Díaz G, Challacombe S, Banerjee D, Douce G, Boyd A, Ivanji J. 2000. Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 18:3223-3229.

Feldmesser M and Casadevall A. 1997. Effect of serum IgG1 to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan on murine pulmonary infection. *J. Immunol.* 158:790-799.

Fernandez MI, Pedron T, Tournebize R, Olivo-Marin JC, Sansonetti PJ, Phalipon A. 2003. Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin A by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells, *Immunity* 18:739–749.

Fine PE. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 346: 1339–1345.

Flesch IEA and Kaufmann SHE. 1991. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun* 59:3121-3218.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA and Bloom BR. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 178:2249–2254.

Flynn JL and Joel D. 2000. Immune response in tuberculosis. *Current Opinion in Immunology* 12:432-436.

Flynn JL and Chan J. 2003. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol* 15:450–455.

Ferguson JS and Schelesinger LS. 2000. Pulmonary surfactant in innate immunity and pathogenesis of tuberculosis. *Tubercle and Lung Dis* 80:173-184.

Garcia LF and Barrera LF. 2004. Perspectives for new anti-tuberculous vaccines in the post-genomic era. *Biomedica.* 24(1):228-238.

Geissmann F, Launay P, Pasquier B, Lepelletier Y, Leborgne M, Lehuen A et al. 2001. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes, *J. Immunol.* 166:346–352.

Glatman-Freedman A and Casadevall A. 1998. Serum therapy for tuberculosis revisited : reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:514-532.

Glatman-Freedman A and Casadevall A. 1999. Serum therapy for Tuberculosis revised: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev 11:514-532.

Glatman-Freedman A, Medrick AJ, Lendvai N, Casadevall A. 2000. Clearance and organ distribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan (LAM) in the presence and absence of LAM-binding IgM. Infect Immun 68:335-341.

Glatman-Freedman A. 2011. The role of antibodies against Tuberculosis. In: Norazmi MN, Acosta A, Sarmiento ME, editors. The Art and Science of Tuberculosis Vaccine Development. 2nd ed Selangor (MY): Oxford University Press; p. 79-109. En prensa

Goil S, Bames C, Thibeault D, Truog WE. 1998. Simplified method for purification of colostrums to obtain secretory component of immunoglobulin A, using secretory component as a reference protein in tracheal aspirate fluid. Journal of chromatography B biomedical sciences and applications 705(2):203-211.

Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV and Orme IM. 2001. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 69:1722–1728.

González E, Armas L, Llanes MJ. 2007. Progress towards tuberculosis elimination in Cuba. Int J Tuberc Lung Dis 11:405–409.

Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser EA et al. 2005. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. J Clin Invest 115:2472-2479.

Gugler E and von Muralt G. 1959. Immuno-electrophoretic studies on human milk proteins. II. Schweiz Med Wochenschr 89:925-929.

Guirardo E, Amat I, Gil O, Diaz J, Arcos V, Caceres N et al. 2006. Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice. Microbes Infect 8(5):1252-1259.

Ha CL and Woodward B. 1998. Depression in the quantity of intestinal secretory IgA and in the expression of the polymeric immunoglobulin receptor in caloric deficiency of the weanling mouse. Lab Invest 78:1255-1266.

Hanson LA. 1959. Comparative analysis of human milk and human blood plasma by means of diffusion-in-gel methods. Experientia 15:473-474.

Hernández-Pando R, Orozco EH, Honour J, Silva P, Rook GAW. 1995. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis a clue to pathogenesis? FEBS Microbiology Immunology 12:63-72.

Hernández-Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva- Sahd L, Madrid MW. 1996. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine

model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89:26-33.

Hernández-Pando R. 1997. Analysis of the local kinetic and localization of interleukin 1, tumor necrosis factor and transforming factor, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 90(4):607-617.

Hernández Pando R, Bornstein QL, Aguilar LD, Orozco EH, Martínez Cordero E. 2000. Inflammatory cytokine production by immunologic and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology*.100:352-358.

Hernández-Pando R, Schon T, Orozco EH, Serafin J, Estrada-Garcia I. 2001. Expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine during evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* 53:257-265.

Hernández-Pando R, Horozco HE, Aguilar D, López F, Rook G. 2004. Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje Bioquímico* vol. XXVIII: 129-153.

Hernández-Pando R, Aguilar D, Hernández R. 2010. The contribution of diverse animal models in the evaluation of new vaccines against tuberculosis. In: Norazmi MN, Acosta A, Sarmiento ME, editors. *The Art and Science of Tuberculosis Vaccine Development*. 1st ed Selangor (MY): Oxford University Press; p. 229-345.

Herr A.B, Ballister ER, Bjorkman PJ. 2003. Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human FcαRI and its complex with IgA1-Fc. *Nature* 423:614–620.

Hirsch LS, Johnson JL, Ellner JJ. 1999. Pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 5(3):143-150.

Hoft DF, Blazevic A, Abate G, Hanekom WA, Kaplan G, Soler JH et al. 2008. A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J Infect Dis* 198:1491-1501.

Holt PG, Schon-Hegrad MA, Phillips MJ and McMenamin PG. 1989. Ia-positive dendritic cells form a tightly meshed network within the human airway epithelium. *Clin Exp Allergy* 19(6):597–601.

Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM et al. 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Nat Acad Sci USA* 100(21):12420-12425.

Hurley WL and Theil PK. 2011. Perspectives on immunoglobulins in colostrums and milk. *Nutrients* 3:442-474.

Hussain R, Shiratsuchi H, Phillips M, Ellner J, Wallis RS. 2001. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in mycobacterial antigen-stimulated monocytes-implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 123:210-218.

James BW, Williams A, Mash PD. 2000. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *J Appl Microbiol* 88:669-677.

Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P. 2001. The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. *J. Immunol.* 167:5185–5192.

Julian E, Matas L, Perez A, Alcaide J, Lanéelle A, Luquin M. 2002. Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of Immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM response to 2,3-Diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose and cord factor antigens. *J Clin Microbiol* 40:3782-3788.

Julian E, Matas L, Alcaide J, Luquin M. 2004. Comparison of antibody responses to a potential combination of specific glycolipids and proteins for test sensitivity improvement in tuberculosis serodiagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:70-76.

Kagina BMN, Abel B, Scriba TJ, Hughes EJ, Keyser A, Soares A et al. 2010. Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns. *Am J Respir Crit Care Med* 182(8):1073-1079.

Kaufmann SH. 2002. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 61(2):54–58.

Kaufmann SH and McMichael AJ. 2005. Annulling a dangerous liaison: Vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature Medicine* 11:33-44.

Kaveh DA, Bachy VS, Hewinson G, Hoyarth PJ. 2011. Systemic BCG immunization induces persistent lung-mucosal multifunctional CD4 T EM cells which expand following virulent mycobacterial challenge. *Plos ONE* 6(6):21566-21579.

Kerr MA. 1990. The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* 271:285–296.

Knechel N. 2009. Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features and diagnosis. *Crit Case Nurse* 29(2):34-43.

Koneman W. 1992. *Micobacterias. Diagnóstico Microbiológico.* 3ra edición. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires. 62.

Koshland ME. 1985. The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu. Rev. Immunol.* 3:425–453.

Kremer L, Dupré L, Riveau G, Capron A, Loch C. 1998. Systemic and Mucosal Immune Responses after Intranasal Administration of Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Expressing Glutathione S-Transferase from *Schistosoma haematobium*. *Infect Immun* 66(12):5669-5676.

Kwon O, Kim J, Kim H, Suh G, Park J, Chung M et al. 1998. Nitric oxide expression in airway epithelial cells in response to tubercle bacilli stimulation. *Respirology* 3:119-124.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.

Lang M and Glatman Freedman. 2006. Do CD1-Restricted T Cells Contribute to Antibody-Mediated Immunity against *Mycobacterium tuberculosis*? *Infection and immunity* 74(2):803–809.

Lawrence RM and Lawrence RA. 1999. *Breastfeeding: A guide for the Medical Professional*. 5th ed. St. Louis, MO: Mosby.

Leakey R. 1993. *La formación de la humanidad*. Barcelona, España: RBA 2.

Lee E and Rikihisa Y. 1997. Anti-Ehrlichia chaffeensis antibody complexed with E. chaffeensis induces potent proinflammatory cytokine mRNA expression in human monocytes through sustained reduction of I π B- α and activation of NF- α β . *Infect Immun* 65(7):2890-2897.

Lesinski GB and Westerink MA. 2001. Vaccines against polysaccharide antigens. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 1:325-334.

Lewellys FB, Michael JB, Peri KR and Jerald CS. 2009. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. *Current Opinion in Immunology* 21:331–338.

Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson Jr WR. 1995. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* 147:1016–1028.

Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. 2002. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 1572:263–273.

Loomes LM, Stewart W, Mazengera RL, Senir BW, Kerm A. 1991. Purification and characterization of human immunoglobulin IgA1 and IgA2 isotypes from serum. *Journal of Immunological Methods* 141:209-218.

López Y, Yero D, Falero-Diaz G, Olivares N, Sarmiento ME, Sifontes S et al. 2009. 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* 299:447-452.

Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E et al. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400:269–271.

Lugton IW. 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic micobacteria. *Immunology and Cell Biology* 77:364-374.

Maglione PJ, Xu J, Chan J. 2007. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 178(11):7222–7234.

Maglione PJ and Chan J. 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*. 39(3):

Marcet R, Méndez I, Castaño JC, Otero O, Lastre M, Pérez O et al. 1999. Obtención de anticuerpos monoclonales contra IgA secretora humana. *Rev Cubana Med Trop* 51(1):33-37.

Marchant CD and Kumar ML. 2002. Immunizations. In: *Pediatric Infectious Diseases: Principles and Practices* (Jenson, H.B. and Baltimore, R.S., Eds.), pp. 232-262. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

Martin C. 2005. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur Resp J* 26:162-167.

Martino A, Sacchi A, Volpe E, Agrati C, De Santis R, Pucillo LP et al. 2005. Non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis* induces the differentiation of human monocytes directly into fully mature dendritic cells. *Journal of Clinical Immunology* 25(4):365-375.

McCune JM, Fu SM, Kunkel HG. 1981. J chain biosynthesis in pre-B cells and other possible precursor B cells, *J. Exp. Med.* 154:138–145.

McGuire EJ, Kerlin R, Cebra JJ and Roth S. 1989. A human milk galactosyltransferase is specific for secreted, but not plasma, IgA. *The Journal of Immunology*, 143(9): 2933-2938.

McKinney JD. 2000. In vivo veritas: the search for TB drug targets goes live. *Nature Med.* 6:1330–1333.

McMurray DN. 2000. A nonhuman primate model for preclinical testing of new tuberculosis vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 30:210–212.

McShane H and Hill A. 2005. Prime-boost immunisation strategies for tuberculosis. *Microbes Infect* 7:962-967.

McShane H and Williams A. 2010. Preclinical evaluation of tuberculosis vaccines. In: Norazmi MN, Acosta A, Sarmiento ME, editors. *The Art and Science of Tuberculosis Vaccine Development*. 1st ed Selangor (MY): Oxford University Press; p. 349-373.

Mederos LM, Fofana AS, Perovani MA, García G, Montoro EH. 2007. Identificación de especies micobacterianas en Cuba. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 26(2):142-145.

Mellman I and Steinman RM. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106(3):255–258.

Miltgen J, Morillon M, Koeck JL, Varnerot A, Briant JF, Nguyen G et al. 2002. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp *canetti*. *Emerg Infect Dis* 8:1350-1352.

Mineo JR, Khan IA, Kasper LH. 1994. *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. *Exp Parasitol* 79:351-361.

Miranda J, Trevisan S, Aparecida K, Munhoz O, Walter A. 2009. A study of IgA antibody response to different *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the diagnosis and monitoring of pulmonary TB. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 13(1):53-58.

Mittrucker HW, Steinhoff U, Kohler A, Krause M, Lazar D, Mex P et al. 2007. Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104;12434-12439.

Miyakawa Y, Ratnakar P, Rao AG, Costello ML, Mathieu-Costello O, Lehrer RI et al. 1996. In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 64(3):926-932.

Monteiro RC and Van De Winkel JG. 2003. IgA Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:177-204.

Moore T, Ananaba GA, Bolier J, Bowers S, Belay T, Eko F et al. 2002. Fc receptors regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology* 105(2):213-221.

Moore T, Ekworomadu C, Eko F, MacMillan L, Ramey K, Ananaba GA et al. 2003. Fc-receptor mediated antibody regulation of T- cell immunity against intracellular pathogens. *J Infect Dis* 188(4):617-624.

Nimmerjahn F and Ravetch JV. 2006. Fc-gamma receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24(1):19-28.

Norazmi MN, Sarmiento M, Acosta A. 2005. Recent Advances in tuberculosis vaccine development. *Curr Resp Med Rev* 1(2):109-116.

Norderhaug IN, Johansen FE, Schjerven H, Brandtzaeg P. 1999. Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit Rev Immunol* 19:481-508.

Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Schimokata K. 1997. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun* 65:3644-3647.

Nys M, Damas P, Laub R, Cloes JM, Lamy M. 1999. Study of the protective effects of hyperimmunoglobulins G and M against endotoxin in mice and rats. *Med Microbiol Immunol* 133:55-64.

O'Brien L, Roberts B, Andrew PW. 1996. In vitro interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages: activation of anti-mycobacterial activity of macrophages and mechanisms of anti-mycobacterial activity. *Curr Top Microbiol Immunol* 215:97-130.

Ogata K, Linzer BA, Zuberi RI, Ganz T, Lehrer RI and Catanzaro A. 1992. Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun* 60(11):4720-4725.

- Olin MR, Armien AG, Cheeran MCJ, Rock RB, Molitor TW, Peterson PK. 2008. Role of nitric oxide in defense of the central nervous system against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases* 198(6):886-889
- Olivares N, León A, López Y, Puig A, Cádiz A, Falero G et al. 2006. The effects of the administration of human gamma globulins in a model of BCG infection in mice. *Tuberculosis* 86:268-272.
- Olivares N, Puig A, Moya A, Cádiz A, Otero O, Izquierdo L et al. 2009. Prophylactic effects of administration of human gamma globulins in a mouse model of tuberculosis. *Tuberculosis* 89:218-220.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS). 2006. Plan Regional de Tuberculosis 2006–2015. Washington DC: OPS/OMS.
- Orme IM and Cooper AM. 1999. Cytokine/chemokine cascades in immunity to Tuberculosis. *Immunol Today* 7:23-29.
- Orme M, McMurray DN, Belisle JT. 2001. Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol* 9:115–118.
- Orme IM. 2003. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis* 83:112–115.
- Otten MA and van Egmond M. 2004. The Fc receptor for IgA (FcαRI, CD89). *Immunol. Lett.* 92:23–31.
- Pack TD. 2001. Purification of Human IgA. *Current Protocols in Immunology*. 2.10B.1–2.10B.7.
- Pasquinelli V. 2008. Contribución de la respuesta inmune del huésped al control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Química Viva* 2:135-159.
- Pérez LC, Viada AM, Rojas JM. 1980. Determination of immunoglobulins in human colostrum. *Rev Chil Pediatr* 51(2):117-120.
- Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ and Corthésy B. 2002. Secretory component: A new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity* 17:107–115.
- Phalipon A and Corthesy B. 2003. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol.* 24:55-58.
- Pichichero ME and Insel RA. 1983. Mucosal antibody response to parenteral vaccination with Haemophilus influenza type b capsule. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 72(5):481-486.
- Rastogi N, Legrand E, Sola C. 2001. Introducción a la nomenclatura y la patogénesis de las micobacterias. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 20(1): 21-54.
- Regnault A, Lankar D, Lacabanne D, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M et al. 1999. Fcγ-

receptor mediated induction of dendritic cell maturation and Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization. *J Exp Med* 189(2):371–380.

Reljic R, Williams A, Ivanyi J. 2006a. Mucosal immunotherapy of tuberculosis: is there a value in passive IgA? *Tuberculosis (Edinb)*. 86(3-4):179-190.

Reljic R, Clark SO, Williams A, Falero-Diaz G, Singh M, Challacombe S et al. 2006b. Intranasal IFN γ extends passive IgA antibody protection of mice against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection. *Clin Exp Immunol* 143(3):467-473.

Renegar KB, Jackson GDF and Mestecky J. 1997. In vitro comparison of the biologic activities of monoclonal monomeric IgA, polymeric IgA and secretory IgA. *J Immunol* 160:1219-1223.

Reynolds HY. 1991. Immunologic system in the respiratory tract. *Physiol Rev* 71:1117-1133.

Reyrat JM y Kahn D. 2001. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? *Trends in Microbiology* 9(10):472-473.

Riordan J and Auerbach K. 1998. *Breastfeeding and Human Lactation*. 2nd ed Boston: Jones and Bartlett.

Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. 1996. Hypothesis: how licensed vaccines confer protective immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 397:169-182.

Robinson JK, Blanchard TG, Levine AD, Emancipator SN, Lamm ME. 2001. A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo. *J. Immunol.* 166:3688–3692.

Rodriguez A, Tjarnlund A, Ivanyi J, Singh M, Garcia I, Williams A et al. 2005. Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* 23:2565–2572.

Romain F, Laqueyrie A, Militzer P, Pescher P, Chavarot P, Lagranderie M. 1993. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infect Immun.* 61(2):742-750.

Romero-Piffiquer MD and Riera CM. 1979. A simple two-step method for purification of secretory IgA from human colostrum. *J Immunol Methods* 30(2):153-159.

Roy E, Stavropoulos E, Brennan J, Coade S, Grigorieva E, Walker B. 2005. Therapeutic efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun* 73:6101-6109.

Royle L, Roos A, Harvey DJ, Wormald MR, van Gijlswijk-Janssen D, Redwan EM, Wilson IA, Daha MR, Dwek RA and Rudd PM. 2003. Secretory IgA N- and O-Glycans Provide a

Link between the Innate and Adaptive Immune Systems. *The Journal of Biological Chemistry* 278(22):20140-20153.

Sabillón F y Abdu B. 1997. Composición de la leche materna. *Honduras Pediatría* Vol. XVÜI - No. (4):120-124.

Sambandamurthy VK, Derrick SC, Hsu T, Chen B, Larsen MH, Jalapathy KV et al. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* DeltaRD1 DeltapanCD: a safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine* 24:6309-6320.

Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T et al. 2000. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 165:2156–2164.

Sato S and Hughes RC. 1994. Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines. *Eur J Immunol* 24:216–221.

Scanga CA, Mohan VP, Joseph H, Yu K, Chan J and Flynn JL. 1999. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infect. Immun.* 67:4531–4538.

Scanga CA, Mohan VP, Tanaka K, Alland D, Flynn JL, Chan J. 2001. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infection and Immunity* 69(12):771-7717.

Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH and Russell DG. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 160:1290–1296.

Schlesinger JJ y Covelli HD. 1977. Evidence for transmission of lymphocyte responses to tuberculin by breast-feeding. *Lancet* 1:529.

Schroeder TJ, Michael AT, First MR, et al. 1994. Variations in Serum OKT3 Concentration Based Upon Age, Sex, Transplanted Organ, Treatment Regimen, and Anti-OKT3 Status. *Therapeutic Drug Monitoring* 16:361-367, 1994.

Schon T, ElMBERGER G, Negesse Y, Pando RH, Sundquist T, Britton S. 2004. Local production of nitric oxide in patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:1134-1137.

Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Korner H. 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol. Today* 21:110–113.

Shah SK and Nathan CF. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5243-5248.

Shreemanta K and Kaufmann S. 2010. Novel tuberculosis vaccines on the horizon. *Current Opinion in Immunology*.

Simon R and Paine R. 1995. Participation of pulmonary alveolar epithelial cells in lung inflammation. *J Lab Clin Med* 126:108–118.

Skeiky YA and Sadoff JC. 2006. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol* 4:469-476.

Skjot RL, Oettinger T, Roswnkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S et al. 2000. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun* 68:214–220.

Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis*. Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence *Clinical Microbiology Reviews* 16(3):463-496.

Soler P, Boussaud V, Moreau J, Bergeron A, Bonnette P, Hance AJ et al. 1999. In situ expression of B7 and CD40 costimulatory molecules by normal human lung macrophages and epithelioid cells in tuberculoid granulomas. *Clin Exp Immunol* 116(2):332–339.

Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MOC. 2009. Pattern and diversity of cytokine production differentials between *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Eur J Immunol* 39:723-729.

Svennerholm AM, Hanson LA, Holmgren J, Lindblad BS, Nilsson B and Quereshi F. 1980. Different secretory immunoglobulin A antibody responses to cholera vaccination in Swedish and Pakistani women. *Infect Immun* 30(2):427-430.

Stop TB Partnership. 2006. The Global Plan to Stop TB 2006–2015. Geneva: WHO.

Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. 2002. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 109:699-705.

Strugnell RA and Wijburg OLC. 2010. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nature Reviews Microbiology* 8:656-667.

Stumbles PA, Upham JW, Holt PG. 2003. Airway dendritic cells: co-ordinators of immunological homeostasis and immunity in the respiratory tract. *Apmis* 111(7–8):741–755.

Sørensen V, Rasmussen IB, Sundvold V, Michaelsen TE, Sandlie I. 2000. Structural requirements for incorporation of J chain into human IgM and IgA. *Int. Immunol.* 12:19–27.

Tagliabue A, Boraschi D, Villa L, Keren DF, Lowell GH, Rappouli R et al. 1984. IgA-dependent cell-mediated activity against enteropathogenic bacteria: distribution, specificity and characterization of the effects cells. *J Immunol* 133:988-992.

Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, Robbins JB, Unanue E, Casadevall A et al. 1998. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15688–15693.

Thaiss CA and Kaufmann SHE. 2010. Toward Novel Vaccines Against Tuberculosis: Current Hopes and Obstacles. *Yale J Biol Med.* 83(4):209–215.

Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA et al. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291(5508):1544-1547.

Tjarnlund A. 2007. Mucosal immunity in mycobacterial infection. Stocolmo University, Sweden. Doctoral Dissertation.

Trajković V. 2004. The role of mycobacterial secretory proteins in immune response in tuberculosis. *Med Pregl* 57(1):25-28.

Trotter CL, Ramsay ME, Kaczmarski EB. 2002 Meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England and Wales: coverage and initial impact of the campaign. *Commun. Dis. Publ. Health* 5:220-225.

Tsai CM and Frasch CE. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 119:115-119.

Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C et al. 2006. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol* 8(2):218–232.

Turner J, Rhoades ER, Keen M, Belisle JT, Frank AA, Orme IM. 2000. Effective preexposure tuberculosis vaccines fail to protect when they are given in an immunotherapeutic mode. *Infect Immun* 68:1706-1709.

Tyagi AK and Khera A. 2004. Protection against tuberculosis: How close are we to a perfect vaccine? *Current Science* 86(1):154-166.

Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jorg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SH. 2004. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in lung. *J Pathol*; 204:217-228

van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. 2002. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 15:294-309.

van Ginkel FW, Nguyen HH, and McGhee JR. 2000. Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 6(2):123-132.

Verreck FA, Vervenne RA, Kondova I, van Kralingen KW, Remarque EJ, Braskamp G et al. 2009. MVA.85A boosting of BCG and an attenuated, *phoP* deficient *Mtb* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques. *PLoS ONE* 4:e5264.

Vordemeier HM, Venkataprasad N, Harris DP, Ivanji J. 1996. Increase of tuberculous infection in the organs of B-cell deficient mice. *Clin Exp Immunol*, 106:312-316.

Walker M. 2002. Core Curriculum for lactation consultant practice. Boston: Jones and Bartlett pp 660.

Walsh GP, Tan EV, De la Cruz EC, Abalos RM, Villahermosa KG, Young LJ et al. 1996. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate

model of tuberculosis that resembles human disease. *Nature Med.* 2:430–436.

Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. 1998. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur Respir J* 11:809-815.

Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. 1999. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest* 103(7):1023–1029.

Wang Y, Curry HM, Zwilling BS, Lafuse WP. 2005. Mycobacteria Inhibition of IFN- γ Induced HLA-DR Gene Expression by Up-Regulating Histone Deacetylation at the Promoter Region in Human THP-1 Monocytic Cells. *J Immunol* 9:5687-5694.

Wayne L, Hollander D, Anderson B, Sramek H, Vadheim C, Rotter J. 1992. Immunoglobulin A (IgA) and IgG serum antibodies to mycobacterial antigens in Crohn's disease patients and their relatives. *Journal of Clinical Microbiology* 30(8):2013-2018.

Williams A, Reljic R, Naylor I, Clark SO, Falero-Diaz G, Singh M et al. 2004. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology* 111:328-333.

Williams A, Hatch GJ, Clark SO, Gooch KE, Hatch KA, Hall GA et al. 2005. Evaluation of vaccines in the EU TB vaccine cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 85(1-2):29-38.

World Health Organization (WHO). 2008. Global tuberculosis control; surveillance, planning financing. WHO/HTM/TB/2008.393. Geneva, Switzerland.

Woof JM and Kerr MA. 2006. The function of immunoglobulin A in immunity. *Journal of Pathology* 208:270-282.

Wright A and Morrison SL. 1997. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Tibtech* 15:26-32.

Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M. 2000. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *J Leukoc Biol* 68(6):897–902.

Yang CS, Yuk JM and Jo EK. 2009. The Role of Nitric Oxide in Mycobacterial Infections. *Immune Network* 9(2):46-52.

Yoo EM, Coloma MJ, Trinh KR, Nguyen TQ, Vuong LU, Morrison SL et al. 1999. Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain. *J Biochem* 274:33771-33777.

Yuan Y, Crane DD, Barry CE. 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol* 178:4484-4492.

Zaldivar M. 2002. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Med Gen Integr*

18(5):352-354.

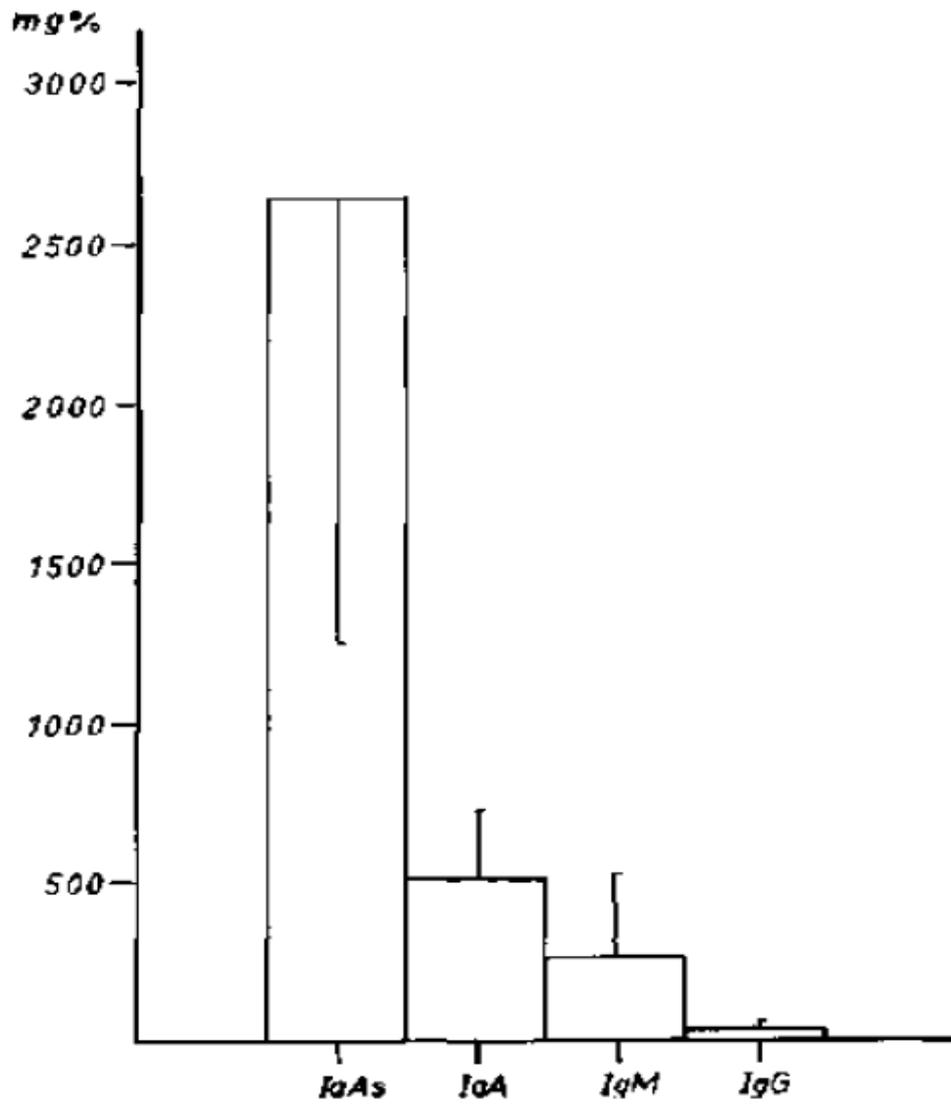
Zganiacz A, Santosuosso M, Wang J, Yang T, Chen L, Anzulovic M et al. 2004. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest* 113(3): 401–413.

ANEXO 1. Receptores de IgA: expresión, distribución tisular, especificidad de unión y funciones

Tomado de Reljic y cols, 2006. Tuberculosis 86(3-4):179-190.

Nombre del Receptor	H- humano R- Ratón	Tipo Celular	Unión a isotipo	Función	Referencia
FcaR, CD89	H	Mieloides	IgA1, IgA2	Fagocitosis, activación celular, ADCC	Monteiro <i>et al.</i> , 2003
pIgR	H, R	Epiteliales	IgAp	Transcitosis en células epiteliales	Mestecky <i>et al.</i> , 1991
ASGPR (asialogluco proteína)	H >R	Hepatocitos	IgA2	Aclaramiento de IgA sérica	Stockert <i>et al.</i> , 1982
Fca/mR	H, R	B, mieloides	IgM, IgA	Fagocitosis	Shibuya <i>et al.</i> , 2000
Transferrina CD71	H, R	B, mesangiales	IgA1	Unión de inmuno-complejos	Moura <i>et al.</i> , 2001
Gal-3/Mac - 2	H, R	Macrófagos	IgA, IgE	Biogénesis del fagosoma?	Reljic <i>et al.</i> , 2004
Receptor células M	R	Epiteliales M	Mouse sIgA hIgA2	Transcitosis a GALT	Mantis <i>et al.</i> , 2002
β 1,4 - galactosil transferasa	H, R	Linfocitos, mieloides	IgA, IgM, IgG	Internalización de inmuno-complejos?	Tomana <i>et al.</i> , 1993
Receptor células T	R	Epitelial T	IgA	Desconocida	Aicher <i>et al.</i> , 1990
Receptor epitelial	H	Intestinal	mIgA	Desconocida	Kitamura <i>et al.</i> , 2000
Receptor células NK	H	NK	SIgA	Muerte celular	Mota <i>et al.</i> , 2003

ANEXO 2. Concentraciones promedio de IgA secretora, IgM e IgG presentes en calostro.
Tomado de Pérez y cols, 1980. Rev Chil Pediatr 51(2):117-120.



IX. Producción científica del autor relativo al tema

Artículos relacionados con el tema:

1. Purificación de inmunoglobulina A secretora a partir de calostro humano. **Nadine Álvarez**, Oscar Otero, Gustavo Falero, Armando Cádiz, Ricardo Marcet, Ana E. Carbonell *et al.* 2010 VacciMonitor; Vol. 19 No. 3.
2. Biodistribución de IgA secretora purificada de calostro humano en fluidos biológicos de ratón Balb/c. **Nadine Alvarez**, Frank Camacho, Oscar Otero, Reinaldo Acevedo, Yolanda Valdés, Daiyana Díaz, Mildrey Fariñas, Luis Izquierdo, María E. Sarmiento, Norazmi Mohd, Armando Acosta (Vaccimonitor) (Aceptado).
3. Towards a new challenge in TB control: Development of antibody-based protection. Armando Acosta, Yamilé López, Norazmi Mohd Nor, Rogelio Hernández Pando, **Nadine Alvarez**, María Elena Sarmiento. En: "Mycobacterium Tuberculosis / Book 3", Pere Cardona. 2011. ISBN 979-953-307-698-9. (Aceptado)
4. The Importance of Animal Models in Tuberculosis Vaccine Development. Armando Acosta, Norazmi Mohd Nor, Rogelio Hernández- Panda, **Nadine Alvarez**, Reinier Borrero, Juan F Infante, María E Sarmiento. Malaysian J Med Sci. Oct-Dec 2011; 18(4): 5-11. (Aceptado)

Otros artículos relacionados:

1. *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. Reinier Borrero, **Nadine Álvarez**, Fátima Reyes, María Elena Sarmiento, Armando Acosta. VacciMonitor 2011;20(1):34-38.
2. Obtención y caracterización parcial de un extracto lipídico de la membrana externa de *Mycobacterium smegmatis*. **Nadine Alvarez**, Reinier Borrero, María de los Ángeles García, Ileana Martínez, Michel Acosta, María de los Ángeles Padrón,

Miguel Echemendía, Ernesto Montoro, Norazmi Mohd, María Elena Sarmiento y Armando Acosta. *VacciMonitor* 2009; Año 18 No. 1, 15-19.

3. Evaluation of the potential of *Mycobacterium smegmatis* as vaccine Candidate against tuberculosis by in silico and in vivo studies. Le Thuy Nguyen Thi, Reinier Borrero, Sonsire Fernández, Giselle Reyes, José Luis Pérez, Fátima Reyes, María de los Angeles García, Midrey Fariñas, Juan Francisco Infante, Yanelly Tirado, Alina Puig, Gustavo Sierra, **Nadine Álvarez**, Juan Carlos Ramírez, María Elena Sarmiento, Norazmi Mohd, Armando Acosta. *VacciMonitor* 2010; Vol. 19 No. 1, 20-26.

Presentación en eventos:

- Human mammary cells as source of prophylactic immunoglobulin A inducing mediators in lungs of a mice model infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunopharmacology* 2011. Varadero, Cuba.
- Passive administration of purified secretory immunoglobulin A from human colostrums induces protection against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model of progressive pulmonary infection. *Immunopharmacology* 2011. Varadero, Cuba.
- Administración intranasal de inmunoglobulina A secretora humana reduce lesiones en pulmón de ratones Balb/c retados con *Mycobacterium tuberculosis*. *Forum* 2011.
- Biodistribución de inmunoglobulina A secretora purificada de calostro humano en fluidos biológicos de ratón Balb/c. *Forum* 2011.

Tutoría de Tesis:

Tutoría de Tesis para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Inmunología, Abril 2011. Evaluación del efecto de la administración de la inmunoglobulina A secretora

humana, en un modelo experimental con *Mycobacterium tuberculosis*. Dra. Ana Emilia Carbonell Rondón.