

Un nuevo enfoque en el estudio de los mecanismos de defensa contra la Tuberculosis. Papel de los anticuerpos específicos

Armando Acosta Domínguez, Gustavo Falero Díaz, Armando Cádiz, Gustavo Sierra, Juan Francisco Infante, María Elena Sarmiento, Annette León, Yamilé López, Nesty Olivares, Máximo Martínez, Aniel Moya, Alexandro Rodríguez, Ania Zayas, Mildrey Fariñas, Zoe Diaz, Keren Hernández, Irelio Rodríguez, María Elena Pérez, Alina Álvarez, Idalis Griñan, Teresita Vidal, Pedro Estévez

Instituto Finlay. Ave. 27 No. 19805, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.
AP 16017, CP 11600. E-mail: aracosta@finlay.edu.cu

RESUMEN

Poco se ha estudiado de los anticuerpos en la defensa contra la Tuberculosis, el presente trabajo incluye nuestros resultados de más de 10 años en esta área. Se llevó a cabo por primera vez el estudio seriado de la respuesta de anticuerpos y la distribución del microorganismo en animales inmunizados con BCG. Después de la inmunización con una genoteca de expresión de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) se estudió seriadamente la respuesta de anticuerpos frente a Mtb y BCG. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales (AcM) poliméricos de la clase IgA contra antígenos de Mtb. Se desarrollaron modelos de protección pasiva mediante estudios de distribución y de reto por infección nasal con Mtb y BCG. Los estudios de protección pasiva se realizaron administrando AcM IgA contra el antígeno de 16 kDa de Mtb y de inmunoglobulinas humanas (Intacglobín) con reto intranasal con BCG. En los estudios de protección activa se aplicó BCG intranasalmente seguido de reto con Mtb por igual vía. También se administraron antígenos recombinantes de Mtb por vía intranasal con reto con BCG por vía endovenosa y Mtb intranasalmente. Los resultados obtenidos en los experimentos de protección pasiva y activa demostraron una significativa disminución del número de micobacterias en los grupos inmunizados con respecto a los grupos control, lo que evidenció el papel protector de los anticuerpos específicos frente a las micobacterias. Estos resultados son novedosos a nivel internacional y de relevancia para el desarrollo de nuevas vacunas y métodos terapéuticos para las infecciones por micobacterias.

Descripción del resultado y discusión de su importancia

Hasta el momento, existe un amplio consenso en el ámbito internacional que le atribuye a los mecanismos de inmunidad mediada por células el papel fundamental en la defensa contra las infecciones por micobacterias, en particular la tuberculosis. La aplicación de este concepto al desarrollo de vacunas no ha logrado hasta el momento ningún preparado con una capacidad protectora superior al BCG, vacuna actualmente en uso y ampliamente cuestionada en su capacidad protectora. Sin embargo, el papel de la inmunidad mediada por anticuerpos específicos frente a las infecciones micobacterianas no ha sido estudiado a pesar de que los mismos pueden jugar un importante papel mediante mecanismos como la lisis mediada por complemento, la potenciación de la fusión del fagolisosoma en el macrófago, la neutralización de toxinas, así como su papel a nivel de la puerta de entrada mucosal, donde es probable que los anticuerpos presentes en las secreciones ejerzan algún papel bloqueador de la entrada de los microorganismos. Teniendo en cuenta esta hipótesis de trabajo, nos dimos a la tarea de estudiar algunos aspectos relacionados con el papel de los anticuerpos específicos en la defensa contra las micobacterias, debido a la potencial aplicación de estos conocimientos al desarrollo de nuevas vacunas y métodos terapéuticos. El presente trabajo muestra los resultados más importantes obtenidos por nuestro grupo en más de 10 años de trabajo en esta línea de investigación.

Para llevar a cabo esta investigación fue necesario desarrollar los siguientes estudios y herramientas metodológicas, las cuales no estaban disponibles a nivel nacional ni internacional:

1. Estudio seriado de la respuesta de anticuerpos específicos después de la administración de BCG a ratones por distintas vías.

2. Estudio seriado de la respuesta de anticuerpos específicos frente a antígenos de *M. tuberculosis* y BCG en ratones inmunizados con una genoteca de expresión de *M. tuberculosis*.

3. Obtención de anticuerpos monoclonales IgA poliméricos y los hibridomas correspondientes, dirigidos contra antígenos de *M. tuberculosis*, los cuales se utilizaron en los modelos de protección pasiva.

4. Desarrollo de modelos en ratón de administración pasiva de anticuerpos monoclonales y sus hibridomas correspondientes, incluyendo el uso de ganmaglobulinas humanas comerciales (Intacglobín). En estos modelos se determinó la distribución de los anticuerpos específicos en distintos fluidos, determinándose las condiciones óptimas de su administración.

5. Desarrollo de modelos de reto mediante la administración intranasal de *M. tuberculosis* y BCG. Estos modelos revisten crucial importancia, ya que el reto por vía de mucosas representa el elemento más importante para evaluar el papel protector de los anticuerpos a nivel mucosal. Como elementos novedosos y de utilidad práctica, estos modelos constituyen una alternativa a los modelos de infección por vía de aerosol, que por su alta peligrosidad, solo se realizan en contados centros a nivel internacional con elevado costo.

Después de desarrollados los elementos metodológicos anteriores se dio paso a los experimentos que probarían nuestra hipótesis de trabajo:

1. Evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos monoclonales IgA contra el antígeno de 16 kDa de *M. tuberculosis* y de los preparados de ganmaglobulinas humanas después de su administración a ratones utilizando el reto con BCG por vía intranasal.

2. Evaluación de la capacidad protectora de la inmunización activa por vía intranasal con BCG y antígenos recombinantes de *M. tuberculosis*.

Descripción del experimento

Estudio de la respuesta de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con BCG por distintas vías

Con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune humoral específica después de la administración de BCG por distintas vías, incluyendo la vía mucosal, y correlacionar la respuesta inducida con la distribución tisular del microorganismo, se inmunizaron ratones Balb/c por las vías endovenosa, subcutánea y oral y se estudió seriadamente, con una periodicidad semanal durante 7 semanas, la respuesta de anticuerpos séricos por ELISA y Western Blot, así como la distribución del microorganismo en cerebro, corazón, riñones, estómago, intestinos, timo, páncreas, ganglios linfáticos mesentéricos y superficiales, glándulas salivales y tejido celular subcutáneo. Se demostró una potente respuesta inmune humoral por ELISA independientemente de la vía de administración, así como el reconocimiento de una amplia gama de antígenos por Western Blot. Estos resultados demostraron por primera vez a nivel internacional demostraron la posibilidad de inducir potentes y amplias respuestas de anticuerpos específicos después de la inmunización con micobacterias por distintas vías, lo cual, brinda soporte experimental para la inmunización con micobacterias para inducir respuestas inmunes humorales específicas en el caso que dichas respuestas posean potencial profiláctico y terapéutico. (Publicaciones 1 y 2, Tesis de Doctorado 1 y Trabajo Destacado en Forum Nacional de Ciencia y Técnica. 1993).

Estudio seriado de la respuesta de anticuerpos específicos frente a antígenos de *M. tuberculosis* y BCG en ratones inmunizados con una genoteca de expresión de *M. tuberculosis*

Teniendo en cuenta la utilidad potencial de la inmunización con ADN para el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis, y la importancia de la inmunización con genotecas de expresión para la identificación de antígenos y genes relevantes para la protección, se llevó a cabo por primera vez a nivel internacional la inmunización de ratones con una genoteca de expresión de *M. tuberculosis*, estudiándose la respuesta inmune humoral específica inducida en dichos animales, mediante el método de Western blot frente a antígenos de *M. tuberculosis* y BCG. En los animales inmunizados se demostró la producción de una respuesta inmune específica frente a una amplia gama de proteínas, entre las que predominaron las proteínas de shock térmico y las de secreción, lo cual es similar a lo obtenido después de la inmunización con microorganismos completos o la infección experimental. Como elemento interesante no reportado hasta el momento

se señala la detección de una respuesta inmune cruzada frente a antígenos de BCG, lo que había sido reportado después de la infección natural y experimental, pero no después de la inmunización con ADN (Trabajos de Diploma 1 y 2, Tesis de Doctorado 2, y Premio Anual del MINSAP 2002).

Generación de hibridomas productores de AcM contra antígenos relevantes de *M. tuberculosis*

Se desarrolló un panel de hibridomas productores de AcM de la clase IgA, específicos para las proteínas de 16 y 38 kDa de *M. tuberculosis*. Se utilizaron como fuente de linfocitos, bazos y glándulas salivales de ratones Balb/c, previamente inmunizados por vía intranasal con estas proteínas conjuntamente con toxina colérica. La utilización de linfocitos provenientes de glándulas salivales para realizar las fusiones es un elemento novedoso a nivel internacional. Los hibridomas se generaron mediante procedimientos establecidos. La talla molecular de los AcM obtenidos se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras y Western blot. Todos los hibridomas obtenidos produjeron anticuerpos de la clase IgA, fundamentalmente en forma dimérica y polimérica, aunque se pudo apreciar una pequeña cantidad de monómero. Se seleccionaron para los estudios posteriores los AcM TBA61, TBA84 (ambos IgA) y TBG65 (IgG1) (Publicación 3).

Estudio de la distribución de los anticuerpos específicos hacia diferentes fluidos corporales después de su administración por distintas vías

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de administración en los modelos de protección pasiva se estudió la transmisión de los AcM seleccionados (contenidos en fluido ascítico) y de un preparado de ganmaglobulinas humanas, hacia la saliva, pulmón y suero de ratones Balb/c después de la administración de estos por vía intranasal, intraperitoneal e intravenosa. Además, se implantaron los hibridomas correspondientes subcutáneamente (Backpack). La aplicación intranasal de los preparados se realizó con dosis entre 20 y 50 μ L, mientras que los volúmenes de aplicación intravenosa e intraperitoneal fueron de 200 y 500 μ L, respectivamente. La implantación subcutánea de los hibridomas se realizó con dosis entre 0.5 y 2×10^6 células contenidas en 500 μ L de PBS. La presencia de los anticuerpos específicos en los diferentes fluidos corporales se determinó mediante ELISA. Los resultados mostraron claramente que la aplicación intranasal es más eficiente que la ruta intravenosa para la transmisión a través del tiempo de diferentes AcM hacia las secreciones pulmonares de ratones Balb/c. Para mantener los niveles de anticuerpos por periodos más prolongados es necesario realizar inoculaciones repetidas. La transmisión limitada de IgA desde la sangre hacia los pulmones tiene además implicaciones para la vacunación, ya que resulta evidente que sólo se lograría eficientemente la inducción de la producción de anticuerpos IgA específicos a nivel de mucosas, mediante la administración de los antígenos correspondientes a ese nivel. Después de la administración a ratones por vía intraperitoneal del preparado de ganmaglobulinas humanas (el cual contiene anticuerpos

específicos contra BCG y *M. tuberculosis*), se demostró el paso de los mismos al suero, la saliva y las secreciones traqueobronquiales, encontrándose los títulos máximos a las dos horas post inoculación. Cuando se aplica este preparado por vía intranasal se detectan anticuerpos específicos solamente en las muestras de saliva y lavados pulmonares, alcanzándose los mayores títulos a las dos horas para saliva y entre 1 y 3 horas para los lavados pulmonares (Publicaciones 2, 3 y 5, Trabajo de Diploma 3).

Modelos de infección intranasal

Se desarrollaron modelos de reto con *M. tuberculosis* y BCG en ratones Balb/c, determinándose su cinética de infección. En el primer caso, los ratones se anestesiaron y se infectaron por vía intranasal con 1.25×10^6 bacilos viables de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* contenidos en 30 μ L. La inoculación se realizó directamente en ambas fosas nasales durante un minuto. Se determinó la cinética de infección hasta los 24 días en pulmón y bazo. Durante los primeros 7 días la infección fue completamente restringida a los pulmones. Posteriormente la infección se disemina al bazo, aunque con un número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) 100 veces inferior que en pulmón, al menos por 3 semanas. Para la evaluación de la infección post vacunación se seleccionó una cosecha temprana de los pulmones entre 7 y 14 días y una cosecha tardía de pulmones y bazo después de 8 semanas. En el segundo caso se inocularon ratones ligeramente anestesiados con células de *M. bovis* BCG-cepa Tokio por vía intranasal, esto se realizó mediante aplicación directa de 50 μ L del inóculo en ambas fosas nasales durante un minuto. Se determinó la cinética de infección hasta los 21 días, solo detectándose presencia de bacilos en pulmón. Para la evaluación de la infección post vacunación se seleccionó una cosecha única 24 horas posteriores al reto. Este modelo de infección mediante aplicación directa en las fosas nasales tiene ventajas sobre el utilizado tradicionalmente mediante infección por aerosol, por ser más económico, reproducible y no implicar alto peligro de transmisión para el operador (Publicación 4 y Trabajo de Terminación de Residencia 1).

Modelos de protección pasiva

Se evaluó la capacidad protectora de un anticuerpo monoclonal IgA dirigido contra la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis* después de su administración a ratones Balb/c por vía intraperitoneal, demostrándose su paso efectivo a saliva y secreciones pulmonares. Los ratones fueron retados con BCG intranasalmente 2 horas después de la inoculación y se sacrificaron a las 24 horas. Se evidenció una disminución significativa del número de UFC en el pulmón de los animales que recibieron este anticuerpo al compararlo con el grupo no inmunizado. La evaluación de la capacidad protectora de preparaciones de anticuerpos humanos frente a un reto con BCG se llevó a cabo mediante la aplicación a ratones Balb/c de un preparado de ganmaglobulina humana por vía intranasal e intraperitoneal y se retaron con BCG-cepa Tokio por vía intranasal 2 horas después. Un grupo extra de animales se inocularon por vía intranasal con 50 μ L de BCG preincubadas con ganmaglobulina humana. Se sacrificaron los animales a las 24 horas post infección, y se le

extrajeron los pulmones para su estudio microbiológico. La administración del preparado de ganmaglobulina humana por vía intranasal e intraperitoneal se comportó como un factor protector al observar una disminución significativa del número de UFC de BCG en los animales retados. Además, la preincubación de BCG con ganmaglobulina humana antes de la inoculación intranasal a ratones, produjo una disminución significativa del número de UFC en estos animales (Trabajo de Terminación de Residencia 1)

Modelos de protección activa

La evaluación de la capacidad protectora de los mecanismos de defensa a nivel de mucosa se llevó a cabo mediante la inmunización de ratones Balb/c con 10^6 UFC de *M. bovis* BCG-cepa Pasteur por vía intranasal bajo condiciones de anestesia ligera, mediante la aplicación directa de 30 μ L de inóculo en ambas fosas nasales durante un minuto. Los animales recibieron una segunda dosis dos semanas después. A las cuatro semanas de la primera inmunización los animales se retaron por la misma vía y con el sistema descrito con 1.25×10^6 bacilos viables de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. A las 2 y 8 semanas después del reto se sacrificaron los animales y se cosecharon los pulmones y bazos, determinándose las UFC en los órganos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la aplicación intranasal de *M. bovis* BCG-cepa Pasteur fue altamente protectora frente a la infección con la cepa patógena H37Rv, encontrándose una reducción de 100 veces las UFC en pulmón y bazo. La fuerte protección conferida por el BCG sugiere que la vía de administración de la vacuna es crucial en su capacidad protectora, demostrándose que la administración por vía mucosal ejerce un marcado efecto protector frente al reto por la misma vía. También en este trabajo se demostró la inducción de resistencia frente al reto con *M. tuberculosis* por vía intranasal después de inmunizar con antígenos recombinantes de *M. tuberculosis* por vía intranasal. En otro experimento se inmunizaron ratones Balb/c por vía intranasal con una mezcla de antígenos recombinantes de *M. tuberculosis* y toxina colérica (adyuvante de comprobada acción de inducción de respuesta de anticuerpos, con poco efecto sobre la inducción de respuestas de tipo Th 1). El volumen total del inóculo fue de 40 μ L, distribuido en ambas fosas nasales. A las dos semanas de la primera inmunización este grupo recibió una reinmunización. Cinco semanas después de iniciado el experimento los animales fueron retados por la vía intravenosa con 10^6 UFC de *M. bovis* BCG-cepa Tokio contenidas en 100 μ L por vía intravenosa. Los animales fueron sacrificados 3 semanas después y se extrajo pulmón y bazo para análisis microbiológico, determinándose las UFC en los órganos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la inmunización con la mezcla de antígenos indujo aumentos significativos de la respuesta de anticuerpos IgG específicos en el suero y el lavado bronquial de los animales inmunizados, sin respuesta detectable de inmunidad celular (medida por estimulación antígeno-específica de los linfocitos esplénicos de los animales inmunizados), lo que se relaciona con las características del adyuvante utilizado. Se demostró el efecto protector

de la administración de la mezcla de antígenos frente al reto con BCG, aunque este efecto fue menor que el inducido por la vacunación con BCG (Publicación 4 y Trabajo de Terminación de Residencia 2).

Resultados de impacto científico del presente trabajo

A. Se realiza el primer reporte a nivel internacional del estudio de la respuesta inmune humoral específica después de la inmunización de ratones con BCG por distintas vías.

B. Se lleva cabo por primera vez a nivel internacional la inmunización con una genoteca de expresión de *M. tuberculosis*, demostrándose la inducción de una amplia gama de respuestas de anticuerpos específicos contra antígenos de *M. tuberculosis* y BCG.

C. Se realiza el primer reporte a nivel internacional de la obtención de anticuerpos monoclonales de la clase IgA poliméricos contra antígenos de *M. tuberculosis*.

D. Se reporta por primera vez la obtención de anticuerpos monoclonales usando células obtenidas de glándulas salivales.

E. Se reporta por primera vez a nivel internacional estudios de biodistribución de anticuerpos monoclonales de la clase IgA contra antígenos de *M. tuberculosis* y de un preparado de ganmaglobulinas humanas en diferentes fluidos corporales de ratones, después de su administración por diferentes vías.

F. Se establecieron biomodelos novedosos para la evaluación de la inmunidad secretora contra *M. tuberculosis*.

G. Se establecieron los modelos de infección intranasal con *M. tuberculosis* y BCG, los cuales ofrecen numerosas ventajas sobre el método tradicional de reto mediante aerosol. Estos modelos pueden ser usados para la evaluación de cualquier preparado vacunal experimental, ofreciendo una variante muy próxima a la vía normal de infección en la tuberculosis.

H. Se demostró el papel protector de los AcM de la clase IgA, específicos para la proteína de 16 kDa, frente al reto con BCG por vía intranasal.

I. La administración del preparado de ganmaglobulina humana por vía intranasal, intraperitoneal, así como la preincubación de los microorganismos con dicho preparado se comportó como un factor protector al observarse una disminución significativa del número de UFC de BCG en los animales retados. Este resultado, además de ofrecer evidencias adicionales sobre el papel de los anticuerpos en las secreciones en la defensa contra las micobacterias, abre la perspectiva de estudios experimentales para evaluar el uso de las ganmaglobulinas comerciales en el tratamiento de la tuberculosis.

J. Se reporta por primera vez que la inmunización intranasal de ratones con BCG tiene mayor efecto protector frente al reto con *M. tuberculosis* que la administración de la vacuna por vía subcutánea, lo que demuestra el papel protector de la inmunidad mucosal y abre nuevas perspectivas a la vacunación con BCG utilizando vías de administración alternativas.

K. Se demuestra que la administración mucosal de antígenos de *M. tuberculosis* induce protección, relacionada con la producción de anticuerpos específicos séricos y en las secreciones traqueobronquiales, incluso en presencia de un reto por vía sistémica con BCG. Este efecto también se evidenció después del reto intranasal con *M. tuberculosis*. Estos resultados constituyeron el primer reporte de inmunización por vía intranasal con antígenos de *M. tuberculosis*.

Colaboradores

Jura Ivanyi, Herve Bercovier, Jorge Luis González, Durdana Rahman, Mukesh Mistry, Gill Douce, Gordon Dougan, Dilip Banerjee, Andrea Boyd, Stephen Challacombe, Avi Hai, Y. Fischman.

Publicaciones científicas

1. Acosta, A; Sarmiento, ME; Gonzalez, A; Estevez, P; Aguila, A; Infante, JF; Izquierdo, L; Capo, V; Sierra, G; Malberty, JA; Martinez, M. "Histopathologic and Humoral Study of Balb/c Mice Inoculated with BCG by Different Routes". Archives of Medical Research Vol. 25 (2): 159-163, 1994.

2. Infante JF; Acosta A, Pérez O, Sarmiento ME, Campa C; Sierra G. "Los biomodelos aplicados al desarrollo de vacunas y sueros en el Instituto Finlay" Animales de Experimentación. La Revista Hispanoamericana. Vol 3 (3) 30-39.1998.

3. Falero-Diaz G, Challacombe S., Rahman D., Mistry M., Douce G., Dougan G., Acosta A., Ivanyi J. Transmission of IgA and IgG Monoclonal Antibodies to Mucosal Fluids following Intranasal or Parenteral Delivery. International Archives of Allergy and Immunology, 122 (2): 143-50, 2000.

4. Falero-Diaz G, Challacombe S., Banerjee D., Douce G., Boyd A., Ivanyi J. Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine, 18: 3223-9, 2000.

5. León A., Acosta A., Sarmiento M.E., Estévez P., Martínez M., Pérez M.E., Falero G, Ivanyi J., Infante J.F., Fariñas M. y Sierra G. Desarrollo de biomodelos para la evaluación de la inmunidad secretora contra *M. tuberculosis* en ratones Balb/c. Vaccinmonitor, 9 (3): 24-30, 2000.