

Desarrollo de biomodelos para la evaluación de la inmunidad secretora contra *M. tuberculosis* en ratones Balb/c

Annette León¹, Armando Acosta¹, María Elena Sarmiento¹, Pedro Estévez¹, Máximo Martínez¹, María Elena Pérez¹, Gustavo Falero¹, Mildrey Fariñas¹, Juan Francisco Infante¹, Juraj Ivanyi², Gustavo Sierra¹.

1. Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.
E-mail: aleon@finlay.edu.cu
2. Departamento de Medicina Oral y Patología. Guy's Hospital. Londres. UK.

Poco se ha estudiado acerca del papel de los anticuerpos específicos, presentes en las secreciones del aparato respiratorio, en la defensa contra patógenos intracelulares, como es el caso de las micobacterias causantes de la tuberculosis en el hombre: *Micobacterium tuberculosis*, *bovis* y *africanum*. Con el objetivo de desarrollar modelos adecuados para evaluar el posible papel de la inmunidad secretora en la defensa contra la tuberculosis, se desarrollaron dos modelos animales con la utilización de un anticuerpo monoclonal IgA dirigido contra la proteína de 16 kD de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. En el primer modelo se inocularon ratones Balb/c, por vía subcutánea al nivel de la nuca, con diferentes cantidades de células del hibridoma TBA61, productor de la IgA específica. En un segundo modelo, se inoculó por vía intraperitoneal líquido ascítico correspondiente a este hibridoma obtenido en ratón. En ambos casos se determinó, a diferentes tiempos, la concentración del monoclonal en saliva y sólo en suero para el segundo. En los dos modelos se demostró el paso del monoclonal a la saliva, donde alcanzó la máxima concentración: a los 21 días en los animales inoculados con el hibridoma, y a las 2 horas en saliva y suero en los animales inoculados con el líquido ascítico. Se sugiere, por su sencillez y mayor inocuidad, el uso del segundo modelo para la realización de estudios de reto por vía mucosal.

Palabras claves: Tuberculosis, inmunidad de mucosa, anticuerpo, hibridoma, IgA.

Introducción

Para conferir un estado protector contra la tuberculosis sólo se cuenta con la vacuna BCG. La variabilidad en su eficacia protectora junto con factores tan serios como la epidemia causada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la creciente incidencia de tuberculosis resistente a antibióticos, ha incitado el desarrollo de nuevas vacunas antituberculosas (1,2).

El posible papel protector de los anticuerpos específicos, producidos por el Sistema Inmune Común de Mucosas (SICM), frente a la agresión de patógenos intracelulares; así como la posibilidad de que estos puedan prevenir o modificar el curso de la infección, está siendo objeto de estudio en esta última década (3-6) y específicamente para la tuberculosis en nuestro grupo.

Para evaluar el efecto protector de la inmunidad secretora frente a las infecciones se han desarrollado modelos experimentales que permiten, de manera controlada, ubicar en las secreciones anticuerpos específicos, para de esta forma después del reto correspondiente evaluar su papel protector. Entre estos se encuentra la inoculación subcutánea al nivel de la nuca, de los hibridomas productores de IgA (Backpack)

específicas a algunos patógenos como *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhimurium* (5,6).

Basados en que los mecanismos de transporte transepitelial pueden garantizar que anticuerpos liberados subcutáneamente pasen a otras secreciones (4,7) donde desarrollan cierto nivel de protección (3,6), y teniendo en cuenta que el papel de los anticuerpos en la tuberculosis ha sido poco estudiado, nos propusimos el desarrollo de modelos animales adecuados para la evaluación de la capacidad protectora, frente a la infección tuberculosa de anticuerpos IgA específicos para antígenos de *M. tuberculosis*. El criterio a seguir consistió en detectar la presencia de los anticuerpos en las mucosas respiratorias de forma controlada. Con ese fin se evaluaron dos variantes experimentales: la administración subcutánea de un hibridoma productor de IgA y la administración intraperitoneal del monoclonal IgA relacionado en forma de líquido ascítico, evaluándose en ambos modelos a través de un ELISA el paso del monoclonal a la saliva, como un indicador de su presencia en las mucosas.

Materiales y Métodos

Animales: Se utilizaron 80 ratones machos de la línea isogénica Balb/c, con un peso entre 18 y 21 gramos suministrados por el CENPALAB, La Habana, Cuba.

Hibridomas y ascitis

- Hibridoma TBA61, productor de IgA contra la proteína de 16 kD de *M. tuberculosis*, obtenido por una colaboración del Departamento de Anticuerpos Monoclonales del Instituto Finlay, La Habana, Cuba y del Dr. Juraj Ivanyi del Guy's Hospital, Londres, Inglaterra.
- Líquido ascítico de ratón correspondiente al hibridoma TBA61, suministrados por el Departamento de Anticuerpos Monoclonales del Instituto Finlay, La Habana, Cuba con una concentración de IgA correspondiente a un título de 2560 determinado por ELISA.

Desarrollo del modelo de implantación subcutánea del hibridoma TBA61

Se confeccionaron cuatro grupos de cinco animales cada uno, que se inocularon por vía subcutánea al nivel de la nuca con tres cantidades diferentes de células provenientes del hibridoma TBA61 resuspendidas en un volumen total de 0,5 mL de medio RPMI 1640 (Sigma, EEUU).

grupo 1	grupo 2	grupo 3	grupo 4
Control negativo	$0,5 \times 10^6$ células	$1,0 \times 10^6$ células	$2,0 \times 10^6$ células

Para la caracterización del modelo se realizó:

1. **Estudio clínico:** Se evaluó cada tres días el comportamiento clínico de los animales que incluyó análisis de la conducta, variación del peso corporal en gramos usando una balanza técnica (Sartorius, Alemania), y determinación del área del tumor mediante la medición del ancho y largo del mismo en milímetros usando un Pie de Rey (Carless Jena, Alemania).
2. **Estudio de la presencia de anticuerpos IgA específicos en saliva:** Se les extrajo saliva a los animales antes de inoculados, así como a los 7, 14, 21 y 30 días siguientes, para determinar por ELISA la presencia de IgA contra la proteína de 16 kD de *M. tuberculosis*.

Desarrollo de un modelo de inoculación intraperitoneal del líquido ascítico correspondiente al hibridoma TBA61

Se confeccionaron dos grupos de 25 y 18 animales cada uno, que fueron inoculados por vía intraperitoneal, con una dosis única de 0,5 mL de líquido ascítico puro de ratón correspondiente al hibridoma TBA61.

- Grupo 1: Se les extrajo saliva a cinco animales diferentes antes de ser inoculados y a las 2, 4, 8 y 24 horas siguientes.
- Grupo 2: Se les extrajo sangre del seno retroorbital del ojo a tres animales diferentes antes de inoculados y a las 0,5; 1, 1,5, 2 y 2,5 horas siguientes.

En todas las muestras se determinó por ELISA, la presencia de IgA contra la proteína de 16 kD de *M. tuberculosis*.

Extracción de saliva: Se le inoculó por vía intraperitoneal a cada animal 50 μ L de pilocarpina al 1% (IMEFA, Cuba) en H₂O destilada y estéril. Al cabo de 1-2 min, la saliva producida se colectó directamente de la boca del animal en microtubos de 1,5 mL (Eppendorf, Alemania).

ELISA para la titulación de saliva y suero: Se utilizaron placas certificadas de 96 pocillos de fondo plano (Costar® 3590, EEUU). Se recubrieron durante 16 horas a 4 °C con el antígeno de 16 kD de *M. tuberculosis* (100 μ L / pocillo), obtenido por vía recombinante y suministrado por el Dr. Juraj Ivanyi, a una concentración de 0,3 μ g / mL en tampón de recubrimiento carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Se bloqueó durante 2 horas a 37 °C con leche descremada (Oxoid, Inglaterra) al 2% en PBS (150 μ L / pocillo). Las muestras de saliva y suero se diluyeron en la solución de bloqueo de forma doble seriada hasta su titulación, partiendo de una dilución inicial de 1:20 y 1:100 respectivamente, y se usó como control negativo muestras de saliva y suero de ratones sanos no inmunizados a las mismas diluciones iniciales respectivamente. Para todos los casos el control positivo fue el líquido ascítico TBA61 sin diluir. Las muestras se aplicaron por duplicado (100 μ L) y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió un conjugado anti α IgA de ratón marcado con peroxidasa (Sigma, EEUU) (100 μ L / pocillo) a una dilución de 1:10000 en solución de bloqueo, y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se reveló la reacción con solución sustrato (5 mg de OPD en 12 mL de tampón citrato de sodio 0,1 M, pH 5, con 5 μ L de H₂O₂), (100 μ L/pocillo). Se detuvo la reacción con H₂SO₄ (2N), (50 μ L / pocillo). Se leyó la absorbancia a

492 nm en un lector de ELISA (Multiskan Multisoft, Finlandia). Entre cada paso se realizaron tres lavados con H₂O-Tween 20 (0,05%).

Procesamiento de las lecturas del ELISA: Se determinó el punto de corte a través de la suma del valor medio de las absorbancias de los controles negativos en cada caso, más dos veces la desviación estándar de estos valores. Todas las lecturas mayores que el valor obtenido se reportaron como positivas y las menores como negativas. La titulación de cada muestra consistió en obtener la máxima dilución positiva, y se expresó el título individual como el inverso de dicho valor. Se determinó el título promedio de cada grupo.

Tratamiento Estadístico: Se determinó la significación estadística de las diferencias entre las variaciones de peso de los animales, tamaño del tumor y niveles de concentración de IgA, por un Análisis de Varianza (ANOVA), con un nivel de significación del 95%. Como análisis complementario se realizó una prueba de Duncan. Además, se determinó el grado de correlación entre el crecimiento del área del tumor y los niveles de IgA específica encontrados en la saliva de los animales a los que se les implantó el hibridoma.

Resultados y Discusión

En la parte superior del tracto respiratorio donde pudiera pensarse que los anticuerpos secretores son los mediadores más importantes de la inmunidad (8, 9), dado que el tratamiento con anticuerpos por vía parenteral es menos efectivo (10, 11), se considera a la IgA como el isotipo de anticuerpo más representado en el tracto respiratorio (12), la cual pudiera prevenir la interacción de los patógenos con el epitelio del tracto respiratorio, bloqueando los sitios de unión y aglutinando los microorganismos, facilitándose su eliminación a través del mecanismo de transporte mucociliar (13). Por protección pasiva se ha visto que la IgA desarrolla una protección mejor que la IgG, quizás por la presencia del transporte preferencial de la IgA polimérica hasta los pulmones después de una inoculación intravenosa (14). Referido a la tuberculosis se ha estudiado muy poco acerca del papel de los anticuerpos frente a la infección con el bacilo tuberculoso. Se han reportado a lo largo de los últimos 50 años, fenómenos de lisis del BCG usando el suero de ratones inmunizados con BCG o de que la fracción gammaglobulina del suero de ratones inmunizados con

PPD puede precipitar antígenos proteicos, aglutinar y neutralizar el bacilo vivo o inhibir el crecimiento del bacilo tuberculoso *in vitro*. Lo que sí puede concluirse es que muchos estudios nos proveen de datos que soportan la idea de que la inmunidad mediada por anticuerpos puede modificar el curso de la infección tuberculosa (15), pero muy pocos han explorado el papel del Sistema Inmune Común de Mucosas (SICM) en esta enfermedad, que es precisamente lo que nos atañe en este trabajo.

Modelo de implantación subcutánea del hibridoma TBA61

Para producir una secreción continua de anticuerpos específicos al nivel de las mucosas, con el objetivo de estudiar más adelante su papel dentro de los mecanismos de infección, se implantó por vía subcutánea al nivel de la nuca de ratones Balb/c, cantidades diferentes de células del hibridoma TBA61, secretor de la IgA específica a la proteína de 16 kD de *M. tuberculosis*.

Estudio Clínico: Los animales presentaron dificultad en su locomoción y alimentación en la medida que el tumor incrementaba su tamaño. A los 21 días su estado vital ya era lo suficientemente crítico como para detener el experimento, idea que se corroboró por el hecho de que a los 28 días murió un animal de cada grupo. Basados en esto se compararon las variaciones de peso de los animales experimentales con respecto a los controles y se siguió el aumento del área del tumor durante todo el experimento con una frecuencia de medición de tres días.

En la Figura 1 se muestra el incremento del peso promedio de cada grupo evaluado con respecto al tiempo. Todos los animales partiendo de un valor promedio inicial de 19 g, fueron aumentando sus pesos paulatinamente hasta 27 g para el grupo control y 27, 26, 64 y 29,15 g para los grupos 2, 3 y 4 respectivamente. Entre estos valores de peso no existen diferencias significativas ($p=0,05$) y la explicación a este fenómeno pudiera estar dada por el hecho de que el tumor aumenta su tamaño y en consecuencia su peso a expensas de la pérdida de peso corporal en los animales. Como resultado, el peso del tumor ha compensando la pérdida de peso de los animales inoculados con respecto al peso de los sanos, pero en los animales que sufrieron el desarrollo del tejido tumoral se vieron afectadas sus funciones vitales, lo que les causó la muerte a algunos de ellos en tiempos superiores a los 28 días.

Figura 1. Comportamiento del peso de los animales inoculados con el hibridoma TBA61. (El Grupo 1 no fue inoculado para ser usado como control). En los animales de los grupos 2, 3 y 4 se inocularon por vía subcutánea al nivel de la nuca 0,5; 1,0 y 2,0 millones de células del Hibridoma TBA61.

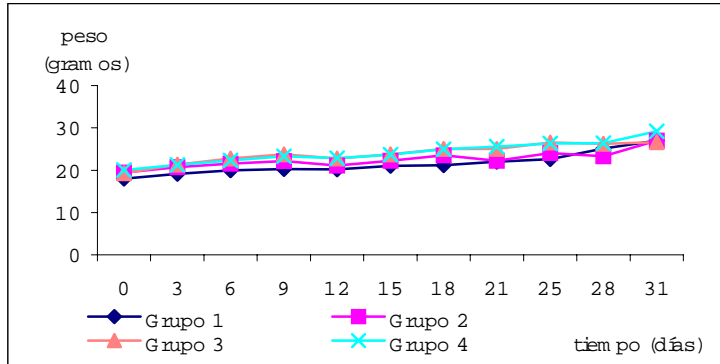
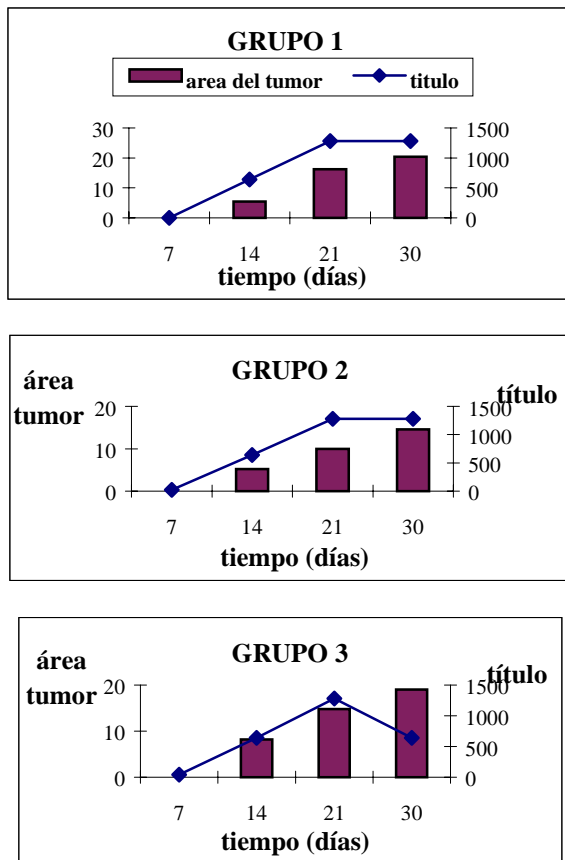


Figura 2. Relación entre el crecimiento del área del tumor (mm²) y los niveles de IgA (determinados por ELISA) en las muestras de saliva extraídas a los animales inoculados con el hibridoma TBA61 (Grupo 1: 0,5 x 10⁶, Grupo 2: 1,0 x 10⁶, Grupo 3: 2,0 x 10⁶ células) en los diferentes tiempos.



En cuanto al crecimiento del tumor, no se detectaron diferencias significativas entre los tres grupos ($p = 0,05$) hasta los 14 días, donde comenzó a ser palpable (área del tumor $> 4 \text{ mm}^2$), alcanzando valores promedios al finalizar el experimento de 310, 267 y 382 mm^2 respectivamente (Figura 2). Estos resultados corroboran la idea de que el crecimiento del tumor afectó el peso de los animales, con independencia de las dosis celulares empleadas.

Estudio de la presencia de anticuerpos específicos de tipo IgA en la saliva:

Las muestras individuales de saliva tomadas en los animales después de implantados con el hibridoma TBA61, a los 7, 14, 21 y 30 días, presentaron en su totalidad lecturas positivas (por ELISA) frente a la proteína de interés. Cada muestra se tituló y se calculó el título de IgA promedio de cada grupo en los tiempos analizados, para construir la cinética que se muestra en los gráficos de la Figura 2.

Al relacionar el incremento del área del tumor con los niveles de IgA en saliva para cada grupo (Figura 2), se obtuvo un nivel de correlación de 0,96; 0,95 y 0,99 para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente. Por lo tanto existe un vínculo muy estrecho entre las dimensiones del tejido secretor del monoclonal IgA específico y los niveles de secreción del mismo en saliva. Su presencia en este fluido es una medida de su paso a otras mucosas como las del sistema respiratorio, digestivo, urogenital, y demás.

Este resultado concuerda con el obtenido por Pierre Michetti y colaboradores (6). Ellos implantaron, en ratones Balb/c subcutáneamente al nivel de la nuca, 10^6 células de hibridomas productores de IgA secretoria contra *V. Cholerae* o contra *S. typhimurium* y concluyeron que el método de Backpack

de implante de un hibridoma, permite la liberación continua de la IgA polimérica en la secreción intestinal, siendo su nivel de secreción proporcional al tamaño del tumor y al nivel del monoclonal en suero.

Sin embargo, el hecho de que para todos los grupos, independientemente del inóculo de células tumorales, se halla alcanzado un título máximo y estable de IgA en saliva a partir de los 14 días, demuestra que no existen diferencias entre las dosis celulares empleadas.

A los 7 días, para el Grupo 1, correspondiente a la menor dosis de inóculo, no se detectó en saliva la presencia de anticuerpos IgA específicos contra la proteína de 16 kD y sí se detectó para los Grupos 2 y 3, correspondientes a las dosis de células tumorales intermedia y mayor, con títulos de 20 y 40 respectivamente. Al cabo de los 14 días todos los grupos registraron un título de 640 que se elevó hasta 1280 a los 21 días y que se mantuvo hasta los 30 días, con excepción en el Grupo 3 donde disminuyó hasta 640, posiblemente provocado por la necrosis de parte del tejido tumoral.

De acuerdo con estos resultados, de las tres cantidades de células ensayadas, la menor parece ser la más adecuada, pues se obtienen los mismos niveles de secreción del monoclonal sin afectar tan drásticamente la vida del animal. A pesar de que el máximo nivel del monoclonal en mucosas se alcanza a los 21 días después de la inoculación del hibridoma, el tiempo óptimo para retar los animales con *M. tuberculosis* no debe ser este, pues se debe tener en cuenta que en los experimentos de este tipo con micobacterias, se lleva a cabo el sacrificio de los animales hasta tres semanas después de la infección. Es de señalar que a partir de este momento el progresivo y previsible deterioro clínico de los animales, provocado por el crecimiento del tumor, harían muy difícil, por no decir imposible, la evaluación del efecto protector de los anticuerpos específicos producidos por el hibridoma. Por ello se recomienda dejar crecer el tumor hasta los 14 días, donde se alcanza un nivel adecuado de IgA en las mucosas, luego retar los animales con el patógeno y continuar las observaciones durante no más de dos semanas. En este tiempo los niveles del monoclonal continuarán aumentando acorde con el crecimiento del tumor, lo cual simulará más fehacientemente un proceso natural de infección por micobacterias y de defensa por parte del SICM.

Modelo de inoculación intraperitoneal de líquido ascítico correspondiente al Hibridoma TBA61

Teniendo en cuenta las dificultades inherentes al modelo de implantación de un hibridoma, se decidió estudiar una alternativa menos agresiva para el animal y que a la vez garantizase nuestro objetivo. En una primera aproximación se decidió trabajar con el líquido ascítico proveniente del hibridoma TBA61 obtenido en ratón, sin

afectar la concentración del monoclonal. Se inocularon 0,5 mL de este en la cavidad peritoneal de los animales de experimentación y se determinaron los niveles de transmisión a diferentes tiempos de este anticuerpo al suero y a la saliva mediante la titulación de las muestras por ELISA.

Cinética de IgA en saliva: Se verificó un aumento significativo ($p = 0,05$) de la concentración de IgA en saliva a las 2 horas con un título de 320, después de inoculado el líquido ascítico. A las 4 horas, el nivel de IgA disminuyó a la mitad, llegando casi al nivel basal a las 24 horas, como puede observarse en la Figura 3.

Cinética de IgA en suero: Los niveles de IgA en suero resultaron ser significativamente más elevados ($p = 0,05$) que los encontrados en la saliva. Se observó el mayor título de 1280 al cabo de las 2 horas (Figura 4), tal y como sucedió en saliva, para luego ir disminuyendo en el tiempo. Por lo tanto se hace evidente la relación existente entre la IgA presente en la saliva y en la sangre. Esta última garantiza el transporte de este monoclonal desde la cavidad peritoneal hasta las diferentes zonas de mucosa donde el receptor de poli-Ig garantiza su transporte hacia el lumen.

De acuerdo con estos resultados, se demostró una transmisión efectiva del monoclonal desde la cavidad peritoneal hasta la saliva, donde llevando a cabo una inoculación única de líquido ascítico, el momento óptimo para realizar un estudio de reto por vía mucosal corresponde a las dos horas postinoculación, suponiendo que la presencia de la IgA en saliva es un indicador de su presencia simultánea en otras secreciones como las de las mucosas traqueo-bronquiales.

Buscando mejorar los niveles de secreción del monoclonal se pudiera partir del anticuerpo específico purificado o en su deficiencia trabajar con ascitis más concentradas. Sería interesante realizar inoculaciones repetidas del líquido ascítico a partir de las dos horas, para de esta forma establecer un período más prolongado de permanencia de la IgA específica en las mucosas a una concentración elevada.

En estudios realizados con el mismo hibridoma y líquido ascítico (inoculado por vía intravenosa e intranasal) se demostró su paso a saliva con una máxima concentración a los cinco días para los animales implantados con el tumor. En el grupo que recibió las ascitis por vía sanguínea se detectó el anticuerpo en saliva al cabo de las 2 horas, mientras que en el grupo que la recibió por vía intranasal, fue a las tres horas.

Figura 3. Cinética de los niveles de IgA (determinado por ELISA) en la saliva de los animales inoculados (IP) con el líquido ascítico correspondiente al hibridoma TBA61.

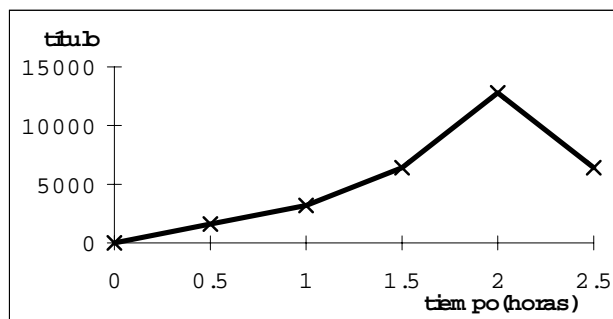
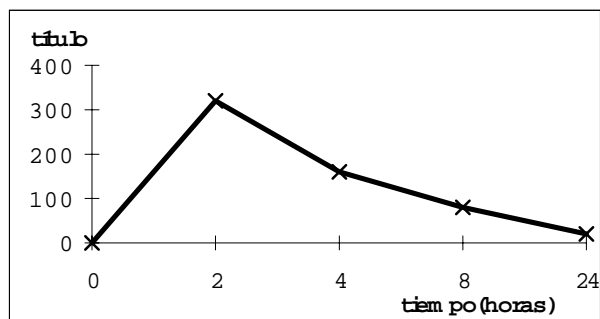


Figura 4. Cinética de los niveles de IgA (determinado por ELISA) en el suero de los animales inoculados (IP) con el líquido ascítico correspondiente al hibridoma TBA61.



Sin embargo no encontraron una elevada transmisión de la IgA producida por el hibridoma a las secreciones bronquiales, pero en el caso de la inoculación del líquido ascítico detectaron altos niveles del monoclonal hasta 24 horas después de su administración intranasal, con un máximo a las tres horas y para la inoculación intravenosa los niveles fueron menores con un máximo a las 24 horas (16).

Al comparar los resultados obtenidos en ambos modelos resulta evidente que el segundo (inoculación intraperitoneal de líquido ascítico

correspondiente al hibridoma TBA61) es más adecuado para estudios de reto con dosis única frente a micobacterias, debido a su simplicidad, menor grado de agresión al animal, menores tiempos de trabajo y mejor control de las variables experimentales. Sin embargo, para realizar estos estudios con niveles del anticuerpo mantenidos por varios días, el implante del hibridoma parece ser el más idóneo, puesto que sin llegar a los tiempos críticos, se secretan a las mucosas niveles de anticuerpo considerablemente elevados.

Referencias

- Orme IM. Progress in the development of new vaccines against tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1997; 1(2):95-100.
- Huebner RE. *Bacillus of Calmette and Guerin (BCG) vaccine*. New York: Ediciones Rom WN y Garay S. 1996.
- Teitelbaum R, Glatman A, Chen B, Robbins JB, Unanue E, Bloom BR. AmAb recognizing a surface antigen of *M. tuberculosis* enhances host survival. *Microbiology*. 1998; 95(26):15688-15693.
- Freedman GA, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *M. tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11:514-532.
- Winner L, Weltzin LA, Mekalanos JJ, Neutra MR. New model for analysis of mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *V. cholerae* infection. *Infect. Immun.* 1991; 59:977-982.
- Michetti P, Mahan MJ, Slauch MJ, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal Secretory Immunoglobulin A Protects Mice against Oral Challenge with the Invasive Pathogen *S. typhimurium*. *Infection and Immunity*. 1992; 60(5):1786-1792.
- Mestecky J, Lue C ad Russell MW. Selective transport of IgA. Cellular and Molecular aspect. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 1991; 20:441-471.
- McIntosh K, Master HB, Orr I, Chao RK, Barking RM. The immunological response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J. Infect. Dis.* 1978; 138:24-32.
- Watt PJ, Robinson BS, Pringle DA. Determinants of susceptibility to challenge and the antibody response of adult volunteers given experimental respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine*. 1990; 8:1231-1236.
- Piazza FM, John MG, Otolini HJ, Schmidt MER, Darnell VG, Prince GA. Immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in cotton rats using IgG in small-particle aerosol. *J. Infect. Dis.* 1992; 166:1422-1424.

11. Walsh EE, Schlesinger MW. Protection from respiratory syncytial virus infection in cotton rats by passive transfer of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 1984; 43:756-758.
12. Mestecky J. The common mucosal immune system and the current strategies for induction of immune response in external secretions. *J. Clin. Immunol.* 1987; 7:265-276.
13. McNabb PC, Tomasi TB. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 1981; 35:477-496.
14. Steinmetz I, Albrecth F, Haussler S, Brenneke B. Monoclonal IgA class-switch variants against bacterial surface antigens: molecular forms and transport into murine respiratory secretions. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24:2855-2862.
15. Freedman AG, Casadevall A. Serum therapy for Tuberculosis Revisited: Reappraisal of the Role of antibody-mediated Immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews.* 1998; 11(3): 514-532.
16. Falero G, Challacombe S, Rhaman D, Mistry M, Dougan G, Acosta A, Ivanyi J. Transmission of IgA and IgG monoclonal antibodies to mucosal fluids following intranasal or parenteral delivery. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2000; 122(2):143-150.

Development of Biomodels for the evaluation of the secretory immunity against *M tuberculosis* in Balb/c mice

Abstract

The role of specific antibodies found in the respiratory tract secretion, in the defense against intracellular pathogens like mycobacterium causing tuberculosis in man (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), has not been studied deeply enough. With the purpose of developing suitable experimental models aimed at the assessment of the secretory immunity role in the defense against tuberculosis, two experimental models were developed using IgA monoclonal antibodies directed against the *M. tuberculosis* and *M. bovis*. 16 kDa protein. In the first model Balb/c mice were subcutaneously inoculated in the neck with different amounts of TBA61 hybridoma cells, which produce the specific IgA. In a second model, this hybridoma's ascitic fluid, obtained from mice, was intraperitoneally inoculated. In both cases, we determined, in different moments, the monoclonal concentration in saliva and only in the second one; we determined the concentration in serum. In the two models we demonstrated the monoclonal's pass to the saliva, reaching its maximum concentration at 21 days in the animals inoculated with the hybridoma and at two hours in saliva and serum in the animals inoculated with ascitic fluid. Due to its simplicity and innocuousness, we recommend the use of the second model for challenging experiments through the mucosal way.

Key words: Tuberculosis, mucosal immunity, Antibodies, hybridoma, IgA