

Purificación de inmunoglobulina A secretora a partir de calostro humano

Nadine Álvarez^{1*}, Oscar Otero¹, Gustavo Falero¹, Armando Cádiz², Ricardo Marcet⁴, Ana E. Carbonell², María E. Sarmiento¹, Mohd-Nor Norazmi³, Armando Acosta¹

¹ Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa. La Habana, Cuba. AP. 16017, CP11600.

² Empresa Productora de Sueros y Hemoderivados "Adalberto Pesant González". Ave 51 No.33 235 km 19 medio 1/2. Arroyo Arenas, La Lisa. La Habana, Cuba. CP 13400.

³ School of Health Sciences, Universiti Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Malaysia.

⁴ Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". La Habana, Cuba.

email: nalvarez@finlay.edu.cu

La inmunoglobulina A (IgA) es el isotipo de anticuerpo más abundante en las secreciones de las superficies mucosales del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario y en secreciones externas como el calostro, la leche materna, las lágrimas y la saliva. En el presente trabajo se obtuvo inmunoglobulina A secretora a partir de calostro humano mediante una combinación de métodos cromatográficos, y su presencia fue demostrada mediante Dot blot. La fracción de IgA fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras, obteniéndose una elevada pureza al identificarse la presencia del componente secretor, la cadena pesada y la cadena ligera de dicha inmunoglobulina, con un patrón de migración correspondiente a sus respectivas masas molares.

Palabras clave: Calostro humano, inmunoglobulina A, componente secretor.

Introducción

La inmunoglobulina A (IgA) es la clase de anticuerpos de mayor síntesis en humanos, existiendo dos subclases: IgA1 e IgA2, con tres halotipos (1). En suero, la IgA suele presentarse en forma monomérica, mientras que en las secreciones aparece mayoritariamente en forma polimérica, fundamentalmente como dímero formado por dos monómeros de IgA, unidos por la cadena de unión J (2). La IgA secretora humana (IgAsh) contiene en su estructura el componente secretor (CS), con siete sitios de N-glicosilación y la cadena J con un sitio N-glicano. El CS está unido de forma covalente en un extremo al dominio C₁-2, y el otro extremo interactúa de forma no covalente y al mismo tiempo con la cadena J y uno de los dominios C₁-3 de la cadena pesada (3). Los N-glicanos del CS proveen a la IgA sitios de unión a las bacterias, además de que asegura la localización in vivo de la IgAs mediante su anclaje a las células epiteliales de las superficies mucosales (4).

El calostro humano posee, entre otros componentes, IgA secretora (IgAs) en elevadas concentraciones (3640 mg/L) (5). Experimentos en conejos neonatos han demostrado claramente que el factor antimicrobiano más importante en la leche materna es la IgAs (6), mientras que el modelo de transporte dependiente del receptor polimérico de inmunoglobulina (pIgR)/CS, explica porqué el calostro y la leche materna son fuentes ricas en IgAs (7). La elevada concentración de IgAs en calostro humano sustenta fuertemente el hecho de que esta inmunoglobulina ejerce una importante función en la protección inmune pasiva contra

las infecciones gastrointestinales y respiratorias. El papel de la IgAsh no ha sido bien detallado en cuanto a la protección inmune frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Consideramos que debido a su importante función en la protección de las superficies mucosales, la IgAsh es un candidato ideal para ser empleado como agente profiláctico y terapéutico. En nuestro estudio nos propusimos obtener IgAs a partir de calostro humano mediante una combinación de métodos cromatográficos.

Materiales y Métodos

Calostro humano

El calostro humano fue obtenido de madres sanas entre los 2 y 4 días posteriores al alumbramiento, colectado de forma manual en frascos de vidrios estériles y almacenados a -20 °C.

Cromatografía de intercambio aniónico

La IgAsh fue purificada a partir de 50 mL de calostro humano, centrifugado durante 1 h a 330 000 g. Se obtuvieron tres fases diferentes: 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 humano. El suero se obtuvo acidificando la fase acuosa con NaCl 1mol/L, pH 6,4 y luego, centrifugado a 13 000 g durante 20 min. Se aplicaron 25 mL del suero en una columna DEAE Sepharose FF, estabilizada con fosfato de sodio 10 mmol/L, pH 7,6. La fracción específica fue eluida con fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 6,4.

* MSc. Departamento de Biología Molecular. Instituto Finlay.

Cromatografía de gel filtración

La fracción de IgA obtenida de la cromatografía de intercambio iónico fue aplicada en una columna cromatográfica con dimensiones de 1,6 x100 cm, empaquetada con Superose 6 grado preparativo (Amersham Biotech, Suecia).

Caracterización de la IgAsh mediante Dot blot y SDS-PAGE

Se utilizó el ensayo de Dot blot para la identificación de la fracción conteniendo la IgAs posterior a la cromatografía de gel filtración. Se aplicaron 100 μ L de cada fracción obtenida en papel de nitrocelulosa bajo vacío. La membrana fue bloqueada con 3% de leche descremada en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se incubó la membrana con anti-IgA humana marcada con peroxidasa (Sigma), diluido 1/2000 en la solución SSTF-Tween 20-leche descremada al 1,5%, durante 1 h en agitación a 37 °C. Se lavó cuatro veces con SSTF-Tween 20 durante 5 min, seguido un lavado con SSTF. La reacción fue desarrollada con diaminobencidina (DAB, Sigma). La fracción de IgAsh identificada por Dot blot (10 μ L) fue incubada a 100 °C por 2 min en presencia de 2-mercaptoetanol (Merck, Alemania) y separada mediante SDS-PAGE (gel de acrilamida al 12,5%) según ha sido descrito (8), seguido de tinción con R250 Azul Coomassie.

Resultados y Discusión

El primer trabajo que demostró la existencia de la IgA como la principal inmunoglobulina de la leche materna humana se reportó hace poco más de medio siglo (9, 10). A partir de ese momento la IgA ha sido purificada empleando diferentes métodos que incluyen: cromatografía de afinidad en una matriz de jacalina-Sepharose (11), cromatografía de intercambio aniónico (12), precipitación con sulfato de amonio y extracción con polietilenglicol (13), por sólo citar algunos. Sin embargo, la matriz de jacalina, a pesar de ser uno de los métodos más eficientes sólo separa la subclase 1 de la IgAs (14), lo cual, teniendo en cuenta que nuestro objetivo consistía en obtener la IgAs total, constituía una limitante. Es por ello que empleamos cromatografía de intercambio iónico, seguida de cromatografía de exclusión molecular, en aras de obtener ambas subclases de IgAs y con el mayor nivel de pureza posible.

La fracción de IgAs se obtuvo en un pico bimodal al realizar cromatografía de intercambio aniónico (Figura 1, P2), eluida con fosfato de sodio 100 mmol/L; pH 6,4, teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico de esta inmunoglobulina es 6,5 (15).

En el cromatograma se observa, además, un primer pico correspondiente a la fracción no unida, eluido con fosfato de sodio 10 mmol/L, pH7,6 (Figura 1, P1) y un tercer pico, eluido con elevada fortaleza iónica o concentración molar,

que pudiera corresponder a otros componentes del calostro (Figura 1, P3). Con el objetivo de incrementar la pureza de la muestra, la fracción de IgA obtenida de la cromatografía por intercambio aniónico (pico P2) se aplicó a una columna empaquetada con Superose 6. La IgA se obtuvo en un único pico simétrico con fosfato de sodio 100 mmol/L pH 6,4 (Figura 2, P1).

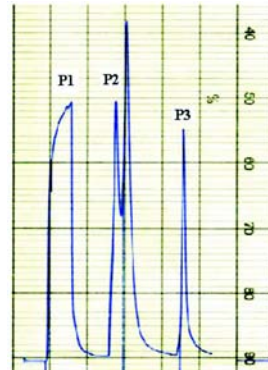


Figura 1. Perfil cromatográfico de la purificación de la IgA a partir de calostro humano por cromatografía de intercambio aniónico en matriz de DEAE-Sepharosa. Pico 1 (P1), fracción eluida con fosfato de sodio 10 mmol/L, pH7,6; Pico 2 (P2), fracción eluida con fosfato de sodio 100 mmol/L; pH6,4; Pico 3 (P3), fracción eluida con NaCl 1 mol/L.

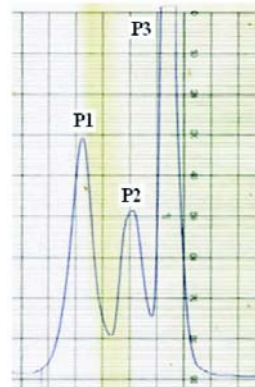


Figura 2. Perfil cromatográfico de la purificación de la IgAs por cromatografía de gel filtración en matriz de Superose 6. Pico 1 (P1), fracción de IgAs; Picos 2 y 3 (P2, P3), corresponden a otros componentes de menor tamaño molecular presentes en la fracción.

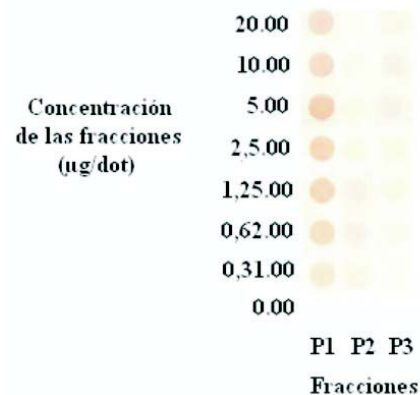


Figura 3. Análisis mediante Dot blot de la presencia de la IgAs en las fracciones obtenidas de cromatografía de gel filtración. P1, P2 y P3, picos 1, 2 y 3 obtenidos de la cromatografía de gel filtración, respectivamente. Los carriles representan concentraciones decrecientes de las fracciones evaluadas.

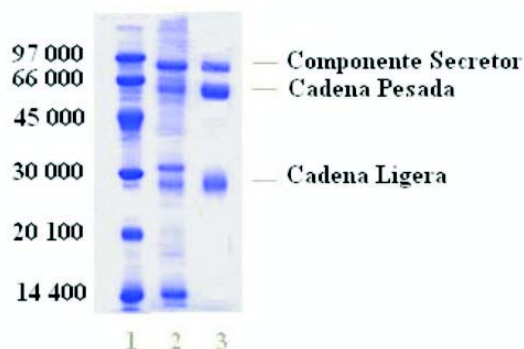


Figura 4. Evaluación mediante electroforesis en SDS-PAGE de la IgAs purificada. Carril 1: proteínas patrones con masas molares expresadas en kDa (Farmacia); Carril 2: calostro humano; Carril 3: fracción de IgAs purificada. Todas las muestras se corrieron en condiciones reductoras.

Para la purificación de la IgAs mediante gel filtración se seleccionó una matriz de Superose 6, teniendo en cuenta que posee un intervalo de exclusión molecular entre 5 – 5000 kDa y la IgAs posee un tamaño molecular de 390 kDa (16). La fracción obtenida de la cromatografía de gel filtración fue identificada mediante Dot blot. Sólo se obtuvo reconocimiento específico en la fracción 1 en todas las diluciones evaluadas, (Figura 3, P1).

Cuando se evaluaron las dos fracciones restantes (P2 y P3), no se evidenció presencia de IgAs, aún en las concentraciones mayores, lo cual valida la selección de los métodos cromatográficos empleados.

Con el objetivo de evaluar la pureza e integridad de la IgAs, esta fue analizada mediante PAGE-SDS, bajo condiciones reductoras (Figura 4).

En la electroforesis se observa la presencia del componente secretor, las cadenas pesadas y ligeras, con un patrón de migración correspondiente a sus masas molares estimadas de 75, 50 y 25 kDa, respectivamente (Figura 4). Este resultado es muy similar al de un trabajo anterior donde se obtuvo IgAs a partir de calostro humano mediante una cromatografía de afinidad agarosa-jacalina (17).

A partir de la purificación de calostro humano mediante la combinación de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de gel filtración, se obtuvo IgAs, lo cual demuestra que los métodos empleados son efectivos para su obtención. Serán necesarios futuros estudios de caracterización para evaluar el reconocimiento específico de esta inmunoglobulina frente a diferentes antígenos de micobacterias.

De igual modo, resultaría de gran interés evaluar la capacidad protectora de la IgAs proveniente de calostro humano frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

Agradecimientos

Agradecemos al personal médico del Servicio de Neonatología de los hospitales maternos de la Ciudad de La Habana (“América Arias”, “González Coro” y “Enrique Cabrera”), quienes contribuyeron con la realización de este trabajo mediante el apoyo en la obtención de calostro humano, especialmente Elizabeth Linares, Hilda Fundicheli, Yamilet Barrios y Nancy Acevedo.

Referencias

1. Yoo EM, Morrison SL. IgA: An immune glycoprotein. *Clinical Immunology* 2005;116:3-10.
2. Woof JM, Ken MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *Journal of Pathology* 2006;208:270-82.
3. Royle L, Roos A, Harvey DJ, Wormald MR, van Gijlswijk-Janssen D, Redwan RM, et al. Secretory IgA N and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J Biol Chem* 2003; 278:20140-53.
4. Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthesy B. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity* 2002;17: 107-15.
5. Lawrence RA. Lactancia materna. En: Lawrence RA. *Curso de Medicina Naturista*. Barcelona: Mosby; 2003. p. 7-16.
6. Dickinson EC, Gorga JC, Garrett M, et al. Immunoglobulin A supplementation abrogates bacterial translocation and preserves the architecture of the intestinal epithelium. *Surgery* 1998;124:284-90.
7. Bradtzaeg P. The secretory immune system of lactating human mammary glands compared with other exocrine organs. *Ann NY Acad Sci* 1983; 409:353-81.
8. Laemmli NK. Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-8.
9. Gugler E, von Mural G. Immuno-electrophoretic studies on human milk proteins. II. *Schweiz Med Wochenschr* 1959;89:925-9.
10. Hanson LA. Comparative analysis of human milk and human blood plasma by means of diffusion-in-gel methods. *Experientia* 1959;15:473-4.
11. Loomes LM, Stewart W, Mazengera RL, Senir BW, Kerrm A. Purification and characterization of human immunoglobulin IgA1 and IgA2 isotypes from serum. *Journal of Immunological Methods* 1991;141:209-18.
12. Balint J, Ikeda Y, Nagai T, Terman DS. Isolation of Human IgA Utilizing Protein A Affinity Chromatography. *Immunological Investigations* 1982;11:283-90.
13. Beetham PK, Glick KB, Dick JW. A comparison of three isolation methods for obtaining immunoglobulin A from Turkey bile. *Avian diseases* 1993; 37:1026-31.
14. Dobos KM, Swiderek K, Khoo KH, Brennan PJ, Belisle JT. Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63:2846-53.

15. Elkon KB. Isoelectric focusing of human IgA and secretory proteins using thin layer agarose gels and nitrocellulose capillary blotting. *Journal of Immunological Methods* 1984; 66:313-21.
16. Bach JF. Secretory immunoglobulin A. In: Bach JF. *Immunology*. New York: John Wiley & Sons Inc; 1982. p. 334.
17. Marcet R, Méndez I, Castaño JC, Otero O, Lastre M, Pérez O, et al. Obtención de anticuerpos monoclonales contra IgA secretora humana. *Rev Cubana Med Trop* 1999; 51(1):33-7.

Purification of secretory immunoglobulin A from human colostrum

Abstract

Immunoglobulin A is the most abundant antibody isotype in secretions from mucosal surfaces of the gastrointestinal, respiratory, and genitourinary tracts and in external secretions such as colostrums, breast milk, tears and saliva. In this study, secretory immunoglobulin A was obtained from human colostrum by a combination of chromatographic methods which was demonstrated by Dot blot. IgA fraction was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions, obtaining a high purity product by identifying the presence of secretory component, heavy and light chains of the immunoglobulin, with a migration pattern corresponding to their respective molecular mass.

Keywords: Human colostrum, Immunoglobulin A, secretory component.

Recibido: Abril de 2010

Aceptado: Mayo de 2010