



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Cuantificación de IgA1 e IgA2 en calostro humano y su
asociación con las enfermedades infecciosas durante el
embarazo”**

T E S I S

Que presenta

QFB. ERICK SAÚL SÁNCHEZ SALGUERO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de tesis:

DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO

Ciudad de México

Agosto, 2017

TUTOR

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Investigador Titular y jefe del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN Zacatenco, Ciudad de México.

ASESORES

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN Zacatenco, Ciudad de México.

Dr. Marco Antonio Vega López

Investigador Titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN Zacatenco, Ciudad de México.

AGRADECIMIENTOS AL CONACYT

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV del I.P.N.), bajo la tutoría del Dr. Leopoldo Santos Argumedo. Durante el desarrollo de esta investigación, se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la beca de maestría No. 592631, en el período 2015-2017.

Este proyecto contó con el apoyo económico del CONACYT, a través del financiamiento del proyecto No. 140442: "Detección de inmunoglobulina A en calostro humano como tamizaje de deficiencia selectiva de IgA en madres y su correlación con infecciones (vías respiratorias y gastrointestinales) en el neonato durante el primer trimestre de vida", otorgado al Dr. Leopoldo Santos Argumedo.

DEDICATORIAS

A mi esposa Alma Alonso, por brindarme su apoyo, por darme tantas satisfacciones y enseñanzas a lo largo del camino. A mis padres y a mi hermano, mis mayores ejemplos y modelos a seguir. A mi familia, por su cariño y consejos durante mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo, por permitirme trabajar con él; por su guía, sus consejos, sus conocimientos y críticas que promovieron la mejora de mi trabajo y mi formación académica. Al Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, por sus observaciones y críticas al trabajo. Y al Dr. Marco Antonio Vega López, por su guía y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

Al MPSS Kaleb Mondragón Ramírez, por su invaluable trabajo en la recolección y toma de las muestras. Al Dr. Julio César Alcántara y la MPSS Zeltzin Mendoza, del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca; al Dr. Víctor Contreras Vargas, a la Dra. Ma. del Rocío Thompson Bonilla y al Dr. Rangel del Hospital 1º de octubre del ISSSTE; al Dr. Arturo Cébulo Vázquez y la Q. Xóchitl del Hospital de la Mujer por su trabajo y apoyo en los procesos administrativos y en la selección de las pacientes en los respectivos hospitales.

Al Dr. Héctor Romero por su asesoría experimental y apoyo en la adquisición de materiales y de reactivos. Al Sr. Lenin Estudillo por su apoyo técnico y amistad. A los integrantes del laboratorio 1 de Biomedicina Molecular por sus consejos, los momentos, las experiencias y la amistad: a los MM. en CC. Zayda, Noe, Daniel y Carolina; a la QFB. Laura, al Dr. Orestes, al QBP. Iván, al pQFI. Miguel y a la pQBP. Zule.

INDICE

Lista de Figuras.....	viii
Abreviaturas.....	x
Resumen.....	xiii
Summary.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características del sistema inmunológico en el neonato	1
1.2 El calostro en la lactancia materna.....	2
1.3 Propiedades moleculares de la IgA	4
1.4 Glicosilación de la IgA.....	6
1.5 Factores que regulan la expresión de la IgA en las mucosas	7
1.6 Glándula mamaria.....	10
1.7 Síntesis y transcitosis de IgAS en el acino mamario.....	14
1.8 Funciones de la IgA.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo General	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 Selección de la población.....	23
5.2 Criterios de inclusión	24
5.3 Criterios de exclusión	24
5.4 Muestreo	25
5.5 Separación de proteínas	26
5.6 Cuantificación de proteínas	26
5.7 Cuantificación de inmunoglobulinas totales	28
5.8 Cuantificación de inmunoglobulinas unidas a componente secretor (SC)	31
5.9 Tratamiento estadístico de los datos	33
6. RESULTADOS	34

6.1 La población de estudio consistió en mujeres de la Zona Metropolitana y de nivel socioeconómico medio bajo.....	34
6.2 La concentración de proteínas en calostro es de 43,91 mg/mL.....	35
6.3 La cantidad de IgA2 es ligeramente mayor que la de IgA1 en una proporción de 1,28 en el calostro.....	37
6.4 La mayor parte de la IgA y toda la IgM presentes en calostro se transportan por transcitosiis a través del pIgR.....	37
6.5 Los datos de la cuantificación de todas las inmunoglobulinas en el calostro describen una distribución no normal.....	38
6.6 Los niveles de IgA1 e IgA2 en el calostro no varían entre los tipos de parto, edades de las madres ni por el número de hijos.....	39
6.7 Las mujeres que presentaron episodios infecciosos durante el embarazo presentan niveles aumentados de IgA1 y niveles disminuidos de IgA2 en calostro con respecto a las mujeres sanas.....	42
6.8 La mayor incidencia de episodios infecciosos en el tracto respiratorio y en piel durante el embarazo aumenta los niveles de IgA1 en calostro.....	44
6.9 La mayor incidencia de episodios infecciosos en el tracto gastrointestinal durante el embarazo aumenta los niveles de IgA2 en calostro.....	46
7. DISCUSIÓN.....	48
8. CONCLUSIONES.....	56
8.1 Cuantificación de Ig e Ig-SC en calostro.....	56
8.2 Correlación entre la [Ig] y el número de episodios infecciosos.....	56
9. PERSPECTIVAS.....	56
10. REFERENCIAS.....	57
11. ANEXOS.....	69
11.1 Cuestionario clínico del expediente de la madre.....	69
11.2 Consentimiento informado.....	72
11.3 Preparación de soluciones.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Subtipos de IgA en humano.

Figura 2. Estructura básica del acino mamario.

Figura 3. Desarrollo de la glándula mamaria en diferentes etapas de la vida.

Figura 4. Tránsito de las células secretoras de anticuerpo, mediado por las moléculas de adhesión y los receptores de quimiocinas.

Figura 5. Estructura del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR).

Figura 6. Estructura del complejo de la IgA secretora.

Figura 7. Estrategia experimental para determinar la correlación entre [Ig] en calostro con el número de infecciones durante el embarazo.

Figura 8. Diseño de placa para la cuantificación de proteínas.

Figura 9. Diseño de placa para la cuantificación de inmunoglobulinas.

Figura 10. La cuantificación de proteínas en calostro no se afecta por el almacenamiento.

Figura 11. La cuantificación de IgA1, IgA2, IgM e IgG totales y asociadas al componente secretor (SC).

Figura 12. Distribución de los datos para IgA1, IgA2, IgM e IgG en calostro entre mujeres sanas y mujeres con al menos un episodio infeccioso.

Figura 13. Estratificación de la población de estudio en función al tipo de parto, edad de la madre y número de parto.

Figura 14. Porcentajes de infecciones asociadas a un compartimento mucosal.

Figura 15. Distribución de Ig en calostro en la población de estudio estratificadas en mujeres sanas y mujeres con al menos un episodio infeccioso.

Figura 16. Los niveles de IgA1 en calostro se aumentan en mujeres con mayor incidencia de episodios infecciosos asociadas al tracto respiratorio y la piel.

Figura 17. Los niveles de IgA2 en calostro aumentan en mujeres con mayor incidencia de episodios infecciosos asociadas al tracto gastrointestinal.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de la población de estudio.

Tabla 2. Distribución de la población de estudio de acuerdo con el nivel socioeconómico.

Tabla 3. Cantidad de mujeres que presentaron episodios infecciosos en uno o más compartimentos mucosales durante el embarazo.

ABREVIATURAS

AID	enzima desaminasa de citidina inducida por activación
BCR	receptor de células B
C_H	región constante de la cadena pesada
C_L	región constante de la cadena ligera
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
g	unidades de fuerza de gravedad
HEV	vénulas de endotelio alto
HRP	peroxidasa de rábano picante
IgA1	inmunoglobulina A subtipo 1
IgA2	inmunoglobulina A subtipo 2
IgAS	IgA secretora
IgAt	IgA total
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicio Social para los Trabajadores del Estado
KDa	Kilodaltons
MadCAM-1	molécula de adhesión celular adhesina vascular mucosal 1
MALT	tejido linfoide asociado a mucosas; del inglés <i>Mucosal associated lymphoid tissue</i>
pIgR	receptor de inmunoglobulinas poliméricas
SC	componente secretor
SIM	sistema inmunológico de las mucosas
TGFβ	factor de crecimiento transformante beta
TMB	3,3',5,5'tetrametilbenzidina
TNFα	factor de necrosis tumoral alfa
Treg	linfocito T regulador
VCAM-1	proteína vascular de adhesión celular 1
V_L	región variable de la cadena ligera
α4β1	integrina cadena alfa 4 beta 1
α4β7	integrina cadena alfa 4 beta 7

RESUMEN

Al nacer, el neonato debe adaptarse a las nuevas condiciones del medio ambiente e interactuar con los antígenos del exterior. Para esto, requiere de los factores que la madre le provea vía transplacentaria, durante el embarazo, y a través de la lactancia, después del nacimiento. El calostro y la leche materna, además de ser fuentes de alimento, también contienen factores que contribuyen a la defensa del recién nacido. Uno de los factores más importantes es la IgA secretora (IgAS), producida localmente por las células plasmáticas en los acinos mamarios y transportada al calostro y la leche por medio de la transcitosis. La IgAS en el recién nacido, jugará un papel importante en su protección, a través de la exclusión inmune y el mantenimiento de la homeostasis.

Una mayor incidencia a padecer enfermedades infecciosas está relacionada con la disminución de los niveles de IgA sérica. Los estudios epidemiológicos que han evaluado el efecto de esta susceptibilidad en los niveles de IgA total (IgAt) de calostro, no encuentran diferencias entre mujeres sanas y mujeres con episodios infecciosos durante el embarazo; o con resultados variables, dependiendo del tipo de vacuna y/o antígeno. La mayoría de estos trabajos se han limitado a la determinación de los niveles de IgAt, sin hacer la diferenciación entre la IgA1 y la IgA2. En México no hay estudios de cuantificación de inmunoglobulinas de esta secreción en población sana.

En este proyecto, se cuantificaron los niveles de inmunoglobulinas en el calostro mediante la técnica de ELISA cuantitativa, con énfasis en los niveles de IgA1 e IgA2. Los resultados indicaron, de manera general, que los niveles de IgA1 aumentan y los de IgA2 disminuyen en el calostro de mujeres que presentaron episodios infecciosos durante el embarazo, con respecto a las mujeres sanas.

Se encontró una correlación entre los niveles más altos de IgA1 en el calostro con el número de infecciones en el tracto respiratorio y en la piel; y de IgA2 con el número de episodios infecciosos en el tracto gastrointestinal durante el embarazo. Esto podría explicarse por que, durante el embarazo, a través de la regulación hormonal, los precursores de células plasmáticas IgA1+ ($\alpha\beta 1+$) o IgA2+ ($\alpha\beta 7+$) pueden migrar a la glándula mamaria y residir en la periferia de los acinos hasta el momento de la lactancia. Los resultados permitirán una mejor comprensión del papel de los subtipos de IgA en la transferencia materna durante las infecciones y en la salud de los recién nacidos.

SUMMARY

At birth, the neonate needs to adapt to new environmental conditions and interact with the outside antigens. In this case, the factors that mother gives through transplacental route, during pregnancy and through breastfeeding, after birth, are required. Colostrum and breast milk, in addition to food sources, also factors that contribute to the defense of the newborn. One of the most important factors of secretory IgA (SIgA), produced locally by plasma cells in mammary acini and transported to colostrum and milk by means of transcytosis. SIgA in the newborn will play an important role in its protection, through immune exclusion and maintenance of homeostasis.

A higher incidence of infectious diseases is associated with a decrease in serum IgA levels. Epidemiological studies that have evaluated the effect of this susceptibility on total IgA (tIgA) levels of colostrum, there are no differences between healthy women and women with infections during pregnancy; or with variable results depending the type of vaccine and/or antigen.

Most of the studies were limited to the determination of tIgA levels, without differentiating between IgA1 and IgA2. In Mexico, there are no immunoglobulin quantification studies of this secretion in healthy population.

In this project, the levels of immunoglobulins in colostrum were quantified using the quantitative ELISA technique, with emphasis on IgA1 and IgA2 levels. The results indicated, overall, that total IgA1 levels increase and IgA2 levels decrease in colostrum in women with infectious episodes during pregnancy, compared with healthy women.

A correlation was found between the highest levels of IgA1 in colostrum with the number of infections in the respiratory tract and skin; And higher IgA2 levels with the number of infectious episodes at the gastrointestinal tract during pregnancy. This may explain because, during pregnancy, hormone regulation, the plasma cell precursors IgA1 + (α 4 β 1 +) or IgA2 + (α 4 β 7 +) can migrate to the mammary gland and reside in the periphery of the acini. The results allow a better understanding of the role of IgA subtypes in maternal transfer during infections and in the health of newborns.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características del sistema inmunológico en el neonato

El proceso del nacimiento implica que el recién nacido pasa de un estado prácticamente estéril al medio ambiente, en el que deberá enfrentarse a las condiciones del exterior y establecer interacciones con una gran cantidad de antígenos (Brandtzaeg & Johansen; 2005) (Victoria et al; 2016).

Anteriormente se creía que, el recién nacido se encontraba en un “estado de inmadurez inmunológica” propia de la edad. Sin embargo, está demostrado que cuenta con un sistema inmunológico funcional capaz de responder a estímulos desde los primeros meses de gestación (Mc Govern et al; 2017). Entre las semanas 11^a y 19^a del desarrollo intrauterino, comienzan a aparecer áreas discretas de linfocitos T y B asociadas a las mucosas (Belkaid & Harrison; 2017). Por lo cual se considera que, en realidad, está en un momento del desarrollo en el que se está adaptando a las nuevas condiciones medioambientales (Demirjian & Levy; 2009) (Kollmann et al; 2017).

Desde el nacimiento los tractos respiratorio y gastrointestinal presentan una respuesta inmunológica innata definida, que se va desarrollando conforme el organismo crece (Guzmán-Bautista et al; 2015) (Kollman et al; 2017). La generación de los centros germinales, estructuras especializadas para la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas de larga vida; ocurre hasta algunas semanas después del nacimiento (Spencer et al; 1986). Estas evidencias demuestran que existe una dependencia a los estímulos externos para la correcta maduración y desarrollo de la respuesta inmunológica (Belkaid & Harrison; 2017).

El origen más importante de estos estímulos antigénicos es la microbiota (Fujimura et al; 2016). Los primeros microorganismos que se establecen en el recién nacido varían dependiendo de la vía del nacimiento (natural o cesárea) (von Mutius; 2017). Durante los primeros días de vida, la microbiota encontrada en piel (Oh et al; 2016) y en las vías respiratorias altas del neonato (Biesbroek et al; 2014) presentan la misma composición que los microorganismos presentes en la vagina de la madre; mientras que en el colon del neonato se

establece una microbiota muy similar a la que se encuentra en la piel de la madre (Fujimura et al; 2016) (Oh et al; 2016). Por lo cual, es necesario que ésta le provea de la experiencia inmunológica necesaria para responder a estos microorganismos, a través de la lactancia materna (Brandtzaeg; 2003) (Costello et al; 2009) (Brandtzaeg; 2010) (Marchant et al; 2017).

El proceso de la lactancia está relacionado con efectos benéficos en la maduración de la respuesta inmunológica del neonato (Ogra et al; 1977) (Vukavic; 1983) (Mei et al; 2009) (Niewiesk; 2014) y la disminución en el riesgo a padecer enfermedades en la edad adulta (Stuebe; 2009).

1.2 El calostro en la lactancia materna

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la madre debe alimentar a su hijo exclusivamente con leche materna los primeros seis meses de vida y acompañar con otros alimentos desde el séptimo mes a los dos años, o hasta que el niño así lo solicite (Brandtzaeg; 2010) (Friedrich; 2016) (Briana et al; 2017).

El calostro, la primera sustancia que se produce durante la lactancia, es una solución coloidal (tipo emulsión) con un valor de pH= 7,45, una densidad de 1,05; con un aporte calórico de 58 Kilocalorías (Kcal). Presenta una viscosidad mayor con respecto a la leche (Godhia & Patel; 2013).

El calostro se caracteriza por un color amarillento dado por la alta presencia de β -carotenos (Godhia & Patel; 2013). Su producción, es en promedio, de unos 60 ± 10 mililitros (mL) y aumenta su volumen en forma progresiva hasta los 100 mL en el transcurso de los primeros tres días postparto, dependiendo de la regulación hormonal al final del embarazo y durante la lactancia (Hartmann et al; 1996), de la intensidad y de la frecuencia del estímulo de succión por el amamantamiento (Brandtzaeg; 2010) (Godhia & Patel; 2013).

En comparación con la leche, la composición del calostro es más estable en función a los factores propios de la madre (Castellote et al; 2011) (Munblit et al; 2016) (Mangel et al; 2017) como el valor del índice de masa corporal (IMC), la

ingesta de proteínas, la paridad y el regreso de la menstruación (Godhia & Patel; 2013).

Mientras que la leche se considera una secreción de aporte nutricional, el calostro es una fuente rica en factores de defensa para el neonato: poblaciones de células del sistema inmunológico, factores de crecimiento, citocinas tanto de perfil inflamatorio como no inflamatorio, y altos niveles de inmunoglobulinas (Ig) (Hurley; 2011)

Las células epiteliales representan el tipo celular más abundante en el calostro, provienen del desprendimiento del epitelio acinar durante el proceso de la lactancia (Ho et al; 1979). En menor proporción, hay una gran cantidad de neutrófilos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos del tipo efector y de memoria (Tuailon et al; 2009); además de plasmablastos y células plasmáticas secretoras de IgA, inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG) (Cacho & Lawrence; 2017).

El calostro contiene citocinas de perfil antiinflamatorio como los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el ácido retinoico (RA) (Castellote et al; 2011) (Ballard & Morrow; 2014) (Briana et al; 2017). La función de estas citocinas, en el recién nacido, está relacionada con el desarrollo epitelial, estimular el proceso de la angiogénesis, regular la migración y la proliferación celular (Briana et al; 2017) (Hernández-Ruiz & Zlotnik; 2017).

Las citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias en el calostro se encuentran en menor proporción comparadas con las citocinas de perfil no inflamatorio. Entre estas están el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8) y el interferón gama (IFN γ) (Kverva et al; 2007). El papel de estas citocinas está relacionado con el reclutamiento de neutrófilos y la polarización del perfil de linfocitos al fenotipo T cooperador tipo 1 (Th1) y a la disminución en las respuestas alérgicas en el neonato (Castellote et al; 2011).

Los macronutrientes del calostro derivan de tres fuentes: Por síntesis *de novo* en las células productoras de leche como los triacilgliceroles, lactosa y caseína;

derivados de los alimentos como las vitaminas y algunos ácidos grasos; y componentes que tienen su origen en las reservas maternas como la glucosa a partir del glucógeno (Ballard & Morrow; 2014) (Briana et al; 2017).

El calostro presenta concentraciones relativamente bajas de carbohidratos (53 mg/mL), en comparación con la leche. En proporción, la mayoría de los azúcares pertenecen al grupo de los oligosacáridos (Ballard & Morrow; 2014). Estos pueden interactuar con los receptores sobre la superficie de microorganismos en la luz de la mucosa evitando su adhesión a través de los receptores del epitelio (Rasmussen et al; 2017).

En el calostro se han reportado pequeñas cantidades de lípidos (29 mg/mL) con un alto contenido de ácidos palmítico y oleico (Ballard & Morrow; 2014), cuya composición puede variar en función al índice de masa corporal, la edad y la alimentación de la madre (Sinanoglou et al; 2017).

Las proteínas son las macromoléculas en mayor cantidad en el calostro humano (alrededor de los 40 mg/mL) (Siegrist; 2003) (Ballard & Morrow; 2014) (Dong et al; 2014). Las principales proteínas en el calostro son: la caseína, la α -lactoalbúmina, la lactoferrina, la lisozima, la albúmina y varios isotipos de inmunoglobulinas (Ballabio et al; 2007) (Briana; 2017), de los cuales, la más abundante es la inmunoglobulina A secretora (IgAS); por lo cual se considera que el calostro es la fuente más importante de ésta última (Brandtzaeg; 2010) (Ballard & Morrow; 2014).

1.3 Propiedades moleculares de la IgA

La inmunoglobulina A (IgA) es una glicoproteína que pertenece a uno de los cinco isotipos de inmunoglobulina (Shroeder & Cavacini; 2013). Es el más abundante en el cuerpo ya que su producción está por encima de los 3 gramos por día (Johansen & Brandtzaeg; 2004).

A nivel sistémico, la IgA tiene una concentración de unos 3,5 mg/mL y una vida media que va de los cinco hasta los seis días (Woof & Russell; 2011), aproximadamente el 97 % de la IgA sérica total se encuentra en una

conformación monomérica (mIgA) con 160 Kilodaltons (KDa) aproximadamente (Brandtzaeg; 2013).

La mIgA presenta una conformación en forma de “Y” o en “T”. Está constituida de dos tipos de cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 55 KDa con 4 dominios de inmunoglobulina (V_H , $C\alpha_1$, $C\alpha_2$ y $C\alpha_3$) y dos ligeras (L) de 25 KDa con 2 dominios de inmunoglobulina cada una (V_L y C_L); ambas cadenas pesadas y ligeras son idénticas entre sí, lo que hace que una misma molécula de anticuerpo presente dos sitios idénticos de unión a su antígeno (Figura 1A) (Woof & Russell; 2011) (Brandtzaeg; 2013).

Al conjunto de los dominios V_L , V_H , C_L y $C\alpha_1$ se le conoce como la región de unión al antígeno (Fab) (Woof & Russell; 2011). A la fracción compuesta por los dos dominios $C\alpha_2$ y los dos $C\alpha_3$ de ambas cadenas pesadas se le conoce como la región cristalizante (Fc). Por exclusión alélica cada IgA presenta solo uno de los dos tipos de cadenas ligeras: kappa (κ) o lambda (λ) en una relación 60:40 en suero (Chintalacharuvu et al; 2002).

En el humano existen dos genes para las cadenas alfa (α_1 y α_2) localizados en el cromosoma 14, que codifican para las dos subclases de IgA: IgA1 e IgA2, con tres alotipos de esta última, IgA2m(1), IgA2m(2) e IgA2m(n). En la población de ascendencia africana se expresa en mayor proporción la IgA2m(2), en población de ascendencia caucásica, la IgA2m(1) y en poblaciones de ascendencia latina y oriental, la IgA2m(n) (Woof & Russell; 2011).

La presencia de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras, unen y estabilizan al monómero de IgA en su conformación cuaternaria (Woof & Russell; 2011) (Kirylyuk & Novak; 2014). La distribución de estos enlaces varía dependiendo del subtipo y alotipo en cuestión (Pabst et al; 2016).

En la IgA1, el residuo de cisteína 133 (Cys133) del dominio de $C\alpha_1$ se une, por puente disulfuro, con la cadena ligera (C_L). La IgA2m(2) carece de este residuo y presenta una cisteína en la posición 220 (Cys220). La IgA2m(n) y la IgA2m(1) comparten un residuo adicional en la cisteína 241 (Cys241); sin embargo, mientras que en la IgA2m(n) está presente una arginina en la posición 221

(Arg221), la IgA2m(1) presenta una prolina en la misma posición (Pro221). Todos los alotipos comparten un enlace disulfuro entre cadenas pesadas en la cisteína 242 (Cys242) y solo la IgA2m(2) contiene dos puentes extras en las posiciones cisteína 299 (Cys299) y cisteína 301 (Cys301) (Chintalacharuvu et al; 2002) (Woof & Russell; 2011). A pesar de estas diferencias estructurales entre los alotipos, no se han reportado diferencias funcionales importantes entre ellos (Pabst et al; 2016).

Estructuralmente, la diferencia más evidente entre los subtipos de IgA es la presencia de una secuencia de entre 13 y 16 aminoácidos en la región bisagra de la IgA1 rica en residuos de prolina (Pro), serina (Ser) o treonina (Thr). La longitud de la región bisagra en la IgA1, le permite adoptar una conformación “en forma de T” (Figura 1A); y la hace susceptible a sufrir escisión por parte de las proteasas de las especies bacterianas *N. meningitidis*, *N gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *S. sanguis*, con una alta especificidad por esta región (Pro-Thr y Pro-Ser) (Senior et al; 2000) (Chintalacharuvu et al; 2003).

La región bisagra de la IgA2 es más corta y no presenta la secuencia de aminoácidos de la IgA1. La IgA2 presenta una conformación “en forma de Y” (Figura 1B) y es más resistente a la acción de las proteasas bacterianas en la luz de la mucosa, lo cual explica, en parte, la mayor proporción de IgA2 en estos compartimentos (la proporción de IgA2:IgA1, de forma general se considera que es 2:3) (Senior et al; 2000) (Chintalacharuvu et al; 2003) (Yoo & Morrison; 2005).

1.4 Glicosilación de la IgA

Ambas subclases de IgA (IgA1 e IgA2) presentan sitios de N-glicosilación: en la IgA1 están localizados en asparagina 263 (Asn263), en el dominio C α 2 y en asparagina 459 (Asn459), en el apéndice. La IgA2m(1) tiene dos sitios de glicosilación en asparagina 166 (Asn166), en el dominio C α 1 y en la asparagina 337 (Asn337), en el dominio C α 2. Mientras que en la IgA2 tiene un dominio de unión en asparagina 211 (Asn211), en el dominio C α 1 (Yoo & Morrison; 2005) (Woof & Russell; 2011) (Dicker et al, 2016).

En la IgA1, los carbohidratos unidos por enlaces de tipo O-glicosídicos son de composición sencilla, es decir, contienen un sólo residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc), mientras que los restantes poseen residuos de galactosa (Gal) y pocos con ácido siálico en el extremo terminal (Kirylyuk & Novak; 2014) (Figura 1).

El grado de glicosilación permite a la IgA aumentar su hidrofiliidad, para poder mantener una solubilidad adecuada en la zona apical de los epitelios (Huang et al; 2015), aumentar su capacidad de unión e interacción con residuos de azúcares en la superficie de patógenos, interaccionar con mucinas, controlar la formación de biopelículas, inhibir la adherencia de los microorganismos a las superficies de las mucosas (Woof & Russell; 2011)

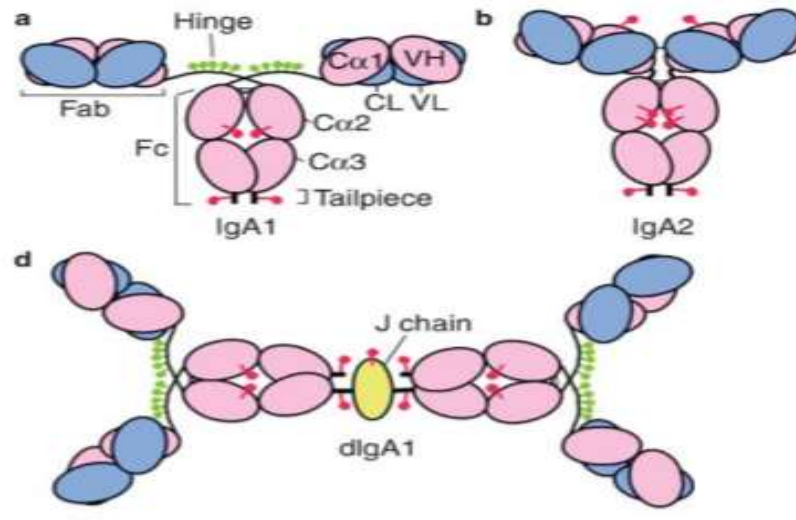


Figura 1. Subtipos de IgA en humano. En los esquemas se muestran los subtipos de IgA; a) IgA1 con su característica forma en “T” por la región bisagra más larga que en la b) IgA2 con su característica forma en “Y”. En azul, los dominios tipo inmunoglobulina de las cadenas ligeras C_L y V_L , mientras que en rosa se muestran los dominios de cadena pesada V_H , $C\alpha_1$, $C\alpha_2$ y $C\alpha_3$, en verde se representan los posibles sitios de O-glicosilación y en rojo los posibles sitios de N-glicosilación distribuidos a lo largo de las moléculas. En las líneas negras delgadas, se muestran los enlaces disulfuro intercadenas y en líneas gruesas el apéndice en el dominio C terminal de ambos subtipos. Importante para la polimerización de la IgA en c) y d) IgAd por la unión con cadena J en amarillo (**Modificado de Woof & Russell; 2011**).

1.5 Factores que regulan la expresión de la IgA en las mucosas

Las mucosas son tejidos especializados de la respuesta inmunológica que presentan distribuciones bien delimitadas de poblaciones celulares como las

células dendríticas, los macrófagos, los neutrófilos, y diferentes poblaciones de linfocitos T y B; que son parte del llamado Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas (MALT, del inglés *mucosal associated lymphoid tissue*).

Dependiendo del tracto o sitio al cual se asocian estas poblaciones celulares, dentro del sistema inmunológico de las mucosas (SIM) (Brandtzaeg; 2010) (Woof & Russell; 2011), estos compartimentos se han clasificado como: el tejido linfoide asociado a nasofaringe, el cual se localiza en las vías respiratorias altas; el tejido linfoide asociado a bronquios, en las vías respiratorias bajas; el tejido linfoide asociado a intestino, en el tracto digestivo, principalmente en los intestinos delgado y grueso; tejido linfoide asociado a tracto urogenital, en los tractos genitales y uretrales de los aparatos reproductores masculino o femenino (Kutteh & Mestecky; 1994); y el tejido linfoide asociado a piel (Meglio et al; 2011).

Los linfocitos B maduros que aún no han tenido contacto con el antígeno, y que acaban de salir de la médula ósea, pueden ingresar a las estructuras del MALT a través de las vénulas de endotelio alto (HEV) (Seong et al; 2017) para su arribo a los sitios inductores dentro del sistema inmunológico de las mucosas (SIM), es decir, sitios donde se induce la respuesta inmunológica (Brandtzaeg; 2010).

La respuesta T dependiente se lleva a cabo en los centros germinales. Los antígenos de microorganismos patógenos en su mayoría y de naturaleza proteica, son captados y transportados a la lámina propia por las células M (Mkaddem et al; 2014). El linfocito B que ha interactuado con su antígeno a través del receptor de célula B (BCR), lo capta, procesa y lo presenta en el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II). La célula B migra desde la zona folicular a la zona extrafolicular para la presentación del antígeno e interacción con los linfocitos T activados. Esto permite la diferenciación del linfocito B a célula plasmática de vida corta (Hargreaves et al; 2001) (Reboldi et al; 2016).

Los linfocitos B que expresan el receptor de la quimiocina C-X-C 5 (CXCR5+) pueden migrar de regreso a la zona oscura del centro germinal, donde

interactuarán con los linfocitos T cooperadores foliculares (T_{FH}) y las células dendríticas foliculares (del inglés *follicular dendritic cells* o FDCs) (Aliberti; 2016). Estas interacciones son críticas para el cambio de clase (del inglés *class switch recombination* o CSR) y la hipermutación somática (del inglés *somatic hypermutation* o SHM). Lo anterior permite la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas de vida larga o a células B de memoria (Rott et al; 2000) (Dicker et al; 2016).

Durante la respuesta T independiente; la diferenciación de los linfocitos B IgA+ se lleva a cabo en la lámina propia en estructuras como los folículos linfoides aislados (ILF), en respuesta a antígenos no proteicos, principalmente de la microbiota comensal. Se facilita por la presencia de las citocinas TGF- β 1, interleucina 10 (IL-10), interleucina 21 (IL-21) y ácido retinoico (Erkelens & Mebius; 2017) (Agace & McCoy; 2017) producidas por células presentadoras de antígeno, células estromales y las mismas células epiteliales en el tejido (Kiryluk & Novak; 2014) (Aliberti; 2016). Estos factores aumentan aún más la producción de TGF β y, por consiguiente, la diferenciación de las células secretoras de IgA (Erkelens & Mebius; 2017).

En general, el proceso de la CSR a IgA se lleva a cabo por la inducción de las vías de señalización que activan a los promotores de la transcripción río arriba de los exones de C_H y la región de cambio que los precede como el TGF- β , interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10); producidas por varias poblaciones celulares en el epitelio y por la unión de CD40 en los linfocitos B con su ligando CD40 en las células T. Dos miembros de la familia del TNF; el factor activador de células B (BAFF) y el ligando inductor de la proliferación (APRIL) estimulan el cambio de clase en células B que expresan IgA (Lin et al; 2014) (Wang et al; 2017) (Sealy et al; 2017).

Finalmente, el aumento en la expresión de la proteína-1 inductora de maduración en linfocito B (Blimp1), permite la diferenciación del linfocito B a plasmablasto y a una célula plasmática productora de anticuerpos (Mora & von Adrian; 2008) (Lin et al; 2014).

Durante este proceso, los precursores de la célula plasmática ya comprometidos a la expresión de un isotipo específico, pueden salir de los sitios inductores, migrar por torrente circulatorio y arribar hasta el lugar de la infección, en los sitios efectores del mismo compartimiento o alcanzar otros sitios convencionales dentro del cuerpo como los tractos digestivo, cérvico vaginal, las vías respiratorias altas y; los sitios efectores no convencionales como la glándula mamaria (Seong et al; 2017).

1.6 Glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula túbulo alveolar, compuesta por 20 lóbulos mamarios distribuidos en forma radial y separados por tejido adiposo, partiendo del pezón a la periferia. Durante la lactancia, que es su etapa de mayor desarrollo; cada lóbulo está formado por unos 100 acinos que se conectan, a través de conductillos intralobulillares e interlobulillares, a un conducto lactífero o galactóforo común; cada uno de estos 20 conductos convergen en el pezón (Gjorevski & Nelson; 2011). La unidad funcional de la glándula mamaria, durante la lactancia, es el acino mamario (Figura 2).

El acino está compuesto por las células alveolares, productoras de leche, y las células mioepiteliales, encargadas de la contracción para la eyección del calostro y de la leche (Gjorevski & Nelson; 2011). La lactancia se lleva a cabo por el estímulo hormonal de la prolactina, los estrógenos y la progesterona, que se producen por la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en la hipófisis en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); y por la galanina y la dopamina, en respuesta al estímulo mecánico de la succión (Brisken & O'Malley; 2010).

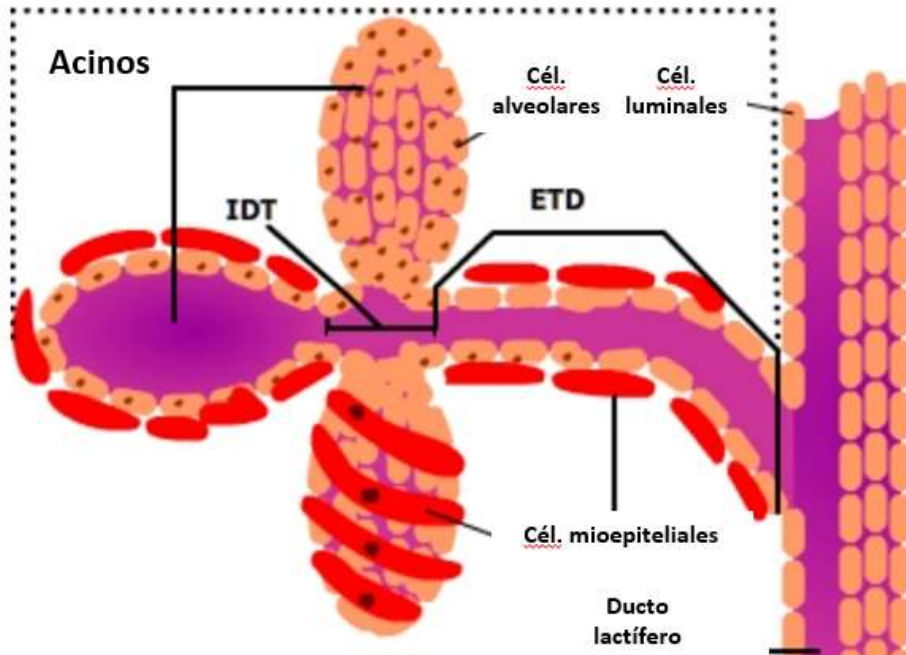


Figura2. Estructura básica de acino mamario. La glándula mamaria presenta acinos compuestos en forma de racimos conectados a un mismo ductillo con zona común o interna (IDT), la cual continúa a la zona de conexión o externa (ETD). Cada uno de estos, desemboca a los ductos lactíferos. El esquema muestra la distribución de las células luminales durante el desarrollo y maduración de la glándula hasta convertirse en células alveolares productoras de leche en acinos maduros. En rojo, las células mioepiteliales distribuidas de forma discontinua alrededor de las células alveolares. Estas células se encargan de la contracción de los acinos y ductos para el transporte y la eyección de la leche. Esta distribución permite que las células alveolares mantengan contacto con la lámina basal y con el estroma; para la captación de nutrientes y la transcitosis de IgA a la luz de los acinos (color morado) **(modificado de RnCeus.com)**.

Sin embargo, estas estructuras no son constitutivas durante todo el tiempo de vida, sino que dependen de la etapa de desarrollo de la mujer (Seong et al; 2017) (Figura 3):

En la pubertad (3A), se inicia el desarrollo de los ductos y ramificaciones mamarios a través de la aparición de brotes terminales (del inglés *terminal end buds* o TEBs) que están constituidos por células basales y luminales (Figura 3a) que responden al estímulo de estrógenos y progesterona para la elongación y desarrollo de estas estructuras (Gjorevski & Nelson; 2011).

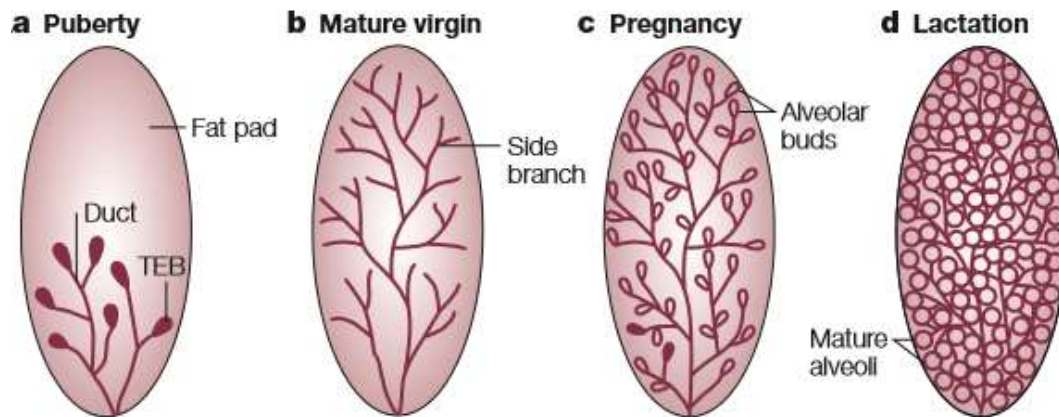


Figura 3. Desarrollo de la glándula mamaria en diferentes etapas de la vida. Se observa el desarrollo de ductos (líneas color vino) y brotes terminales (círculos rellenos color vino) durante la pubertad (3A) y el inicio de desarrollo mamario por regulación hormonal estrogénica durante la primera parte del ciclo menstrual y progestágena en la segunda mitad. En la madurez (3B), las glándulas mamarias. En el embarazo (3C) se presentan ductos bien ramificados en prácticamente gran parte del estroma mamario. Durante esta etapa las células luminales empezarán a madurar para generar acinos mamarios por la señal de progesterona y de estrógenos para el inicio de la lactancia (3D), en donde a la glándula mamaria se encuentra completamente funcional con acinos lactíferos bien desarrollados, en respuesta a la prolactina (**Henninghausen & Robinson; 2005**).

En la edad sexual madura (Figura 3B), la cantidad de ductos bien desarrollados en el estroma mamario abarca más del 80 % del tejido con una gran riqueza de inervaciones y sin TEBs evidentes (Butner et al; 2017), el proceso de ramificación está bien regulada a través de la señalización de TGF β para iniciar la vía de Wnt5A (Bahrami et al; 2017) (Zhou et al; 2017) permitiendo el proceso de desarrollo epitelial e inhibir el proceso de ramificación o *branching* (Smith; 2017) o ramificación dependientes de la geometría epitelial y contracción de actina a través disminución de gradientes mecánicos (McBryan & Howlin; 2017) (Koledova & Lu; 2017), mientras que el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la metaloproteasa 14 (MMP14), por señalización de Rho/ROCK, inducen el desarrollo celular y la penetración a tejido adiposo (Gjorevski & Nelson; 2011) (Smith; 2017).

Durante las etapas finales del embarazo (Figura 3C) y toda la lactancia (Figura 3D), la prolactina es la principal hormona reguladora en la glándula mamaria. La acción de la prolactina inicia cuando esta se une a su receptor en las células

epiteliales (PRLr) para activar la síntesis de los compuestos del calostro, iniciando la diferenciación de las células alveolares lactogénicas y la maduración de los acinos mamarios (Brisken & O'Malley; 2010) (Butner et al; 2017). La isoforma B de la progesterona tiene una función directa en la expansión y diferenciación de los alveolos en la mama, y los estrógenos (Thiebaut et al; 2017), permite el desarrollo y el crecimiento y la ramificación de los ductos en la glándula (Smith; 2017).

A través del estímulo hormonal durante los últimos momentos del embarazo y la lactancia, varias poblaciones de células del sistema inmunológico pueden recircular a la glándula mamaria (Figura 4), como las células productoras de anticuerpo IgA+ que participan en la producción, formación y secreción de la IgAs de calostro y la leche (Roux et al; 1977) (Kunkel & Butcher; 2003).

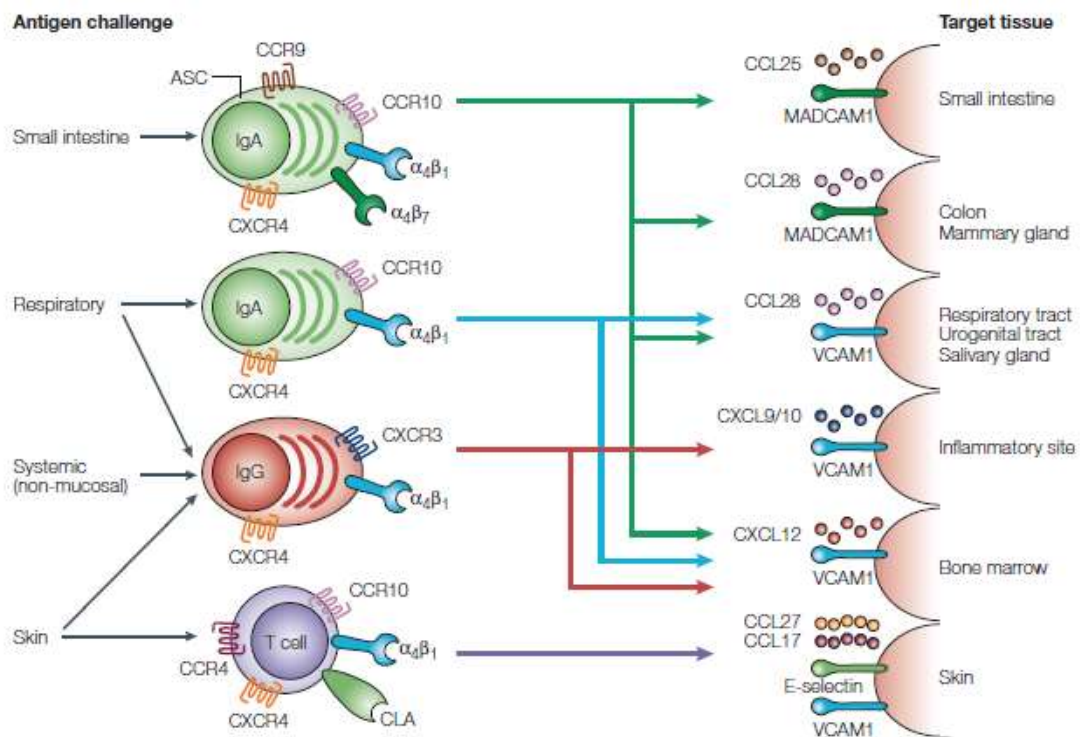


Figura 4. Tránsito de las células secretoras de anticuerpos mediado por las moléculas de adhesión y los receptores de quimiocinas. La recirculación de linfocitos a un tejido efector está regulada por la expresión de quimiocinas y direccioninas. Los plasmablastos IgA+ inducidos en el intestino delgado pueden entrar a otros sitios mucosales por la expresión de CCR4, CCR9, CCR10 y las integrinas $\alpha_4\beta_7$ y $\alpha_4\beta_1$; plasmablastos inducidos en el tracto respiratorio están restringidos a migrar a sitios efectores no intestinales (Kunkel & Butcher; 2003).

1.7 Síntesis y transcitosis de IgAS en el acino mamario

En las mucosas, la IgA se encuentra casi de manera exclusiva en forma dimérica (IgAd) con 340 KDa, consta de 2 monómeros de IgA unidos por la cadena J (CJ) (Figura 1D) (Woof & Russell; 2011) o como complejo de IgA secretora (IgAS) con 420 KDa (Brandtzaeg; 2010) (Mantis et al; 2011) (Woof & Russell; 2011).

La capacidad de polimerización y formación de las IgAd y la IgAS en las mucosas, específicamente en el acino mamario, es posible, gracias a que la IgA tiene un apéndice de 18 aminoácidos en el extremo C terminal con una cisteína en la posición 471 (Cys471), importante para su asociación con la CJ (Castro & Flajnik; 2014).

La CJ, presenta ocho residuos de cisteína de los cuales 6 forman enlaces intracatenarios entre la cisteína 13 con la cisteína 101 (Cys13-Cys101), la cisteína 72 con la cisteína 92 (Cys72:Cys92), la cisteína 109 con la cisteína 134 (Cys109-Cys134) (Strugnell & Wijburg; 2010). La CJ promueve el proceso de polimerización de la IgA por la unión de sus residuos de cisteína (Cys14 y 68) a las cisteínas de cada apéndice que solo se encuentran en las formas secretadas de las cadenas pesadas de IgA (Castro & Flajnik; 2014). Presenta un único sitio de N-glicosilación en la posición asparagina 48 (Asn48) que contribuye a la dimerización del complejo, pues participa en la correcta orientación espacial de la CJ con los extremos C de cada IgA y su correcta unión (Johansen et al; 2001).

La cadena J es necesaria para la asociación de la IgAd con el receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) en la cara baso lateral de las células epiteliales del acino, encargadas de la transcitosis de la IgAS (Sørensen et al; 2000) (Brandtzaeg; 2010) (Johansen & Kaetzel; 2011).

El modelo de expresión de la cadena J está regulado, por las condiciones fisiológicas que se tengan, a nivel sistémico y en las mucosas. La expresión de la cadena J está mediada por los mismos factores que permiten la expresión de la IgM y para la diferenciación de los linfocitos B a las células secretoras de IgA

en las mucosas, lo cual explica la mayor proporción de las inmunoglobulinas poliméricas presentes en estos sitios (Castro & Flajnik; 2014).

También se han descrito funciones de la CJ dependiendo del isotipo de inmunoglobulina al cual se haya asociado. Al estar asociada a la IgM pentamérica disminuye la capacidad de esta para activar complemento (Michaelsen et al; 2017); mientras que, en el caso de la IgA, aumenta su capacidad de interactuar a diferentes antígenos, al incrementar el grado de glicosilación de la inmunoglobulina (Yoo & Morrison; 2005).

A nivel sistémico, la presencia de los factores que regulan la expresión o función de la cadena J, como enzimas que degraden a esta cadena y que se expresarán en un perfil de citocinas proinflamatorio a nivel sistémico (como el IFN α); permitiría que las células plasmáticas liberarán únicamente IgA monomérica (Castro & Flajnik; 2014).

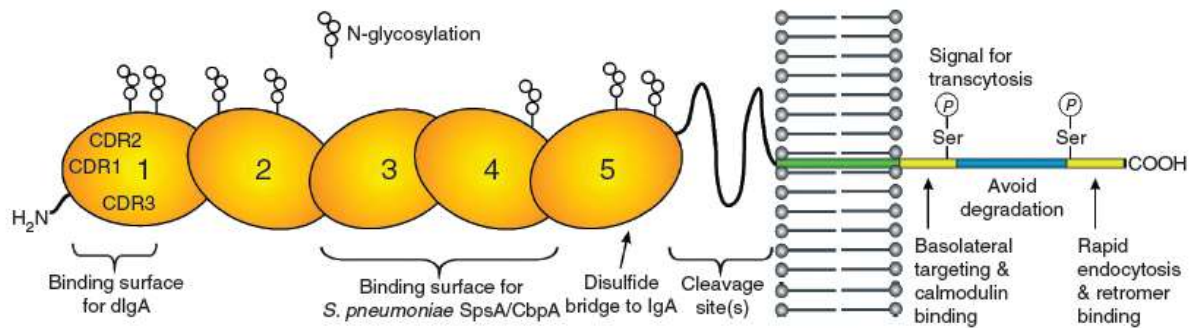


Figura 5. Estructura del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR). Esquema del pIgR donde se muestra su porción extracelular que se considera el SC con sus cinco dominios tipo inmunoglobulinas con la distribución de residuos de N-glicosilación y en la parte inferior se indican las zonas de interacción con la IgAd. El dominio transmembranal en verde y el dominio intracelular en amarillo y azul con las indicaciones de localización de señales para transcitosis de pIgR (Kaetzel; 2005).

El componente secretor (SC, del inglés *secretory component*) (Figura 5) es el producto de escisión del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR). Este receptor es una molécula de 100 KDa con 5 dominios tipo inmunoglobulina numerados desde D1 a D5, a partir del extremo N terminal, con un residuo globular donde se llevará a cabo su escisión. Consiste en una región extra citoplásmica de 589 aminoácidos, con un dominio intermembrana de 23

aminoácidos y 103 residuos que constituyen el dominio citoplásmico (Kaetzel; 2005) (Michaelsen et al; 2017).

El pIgR recién sintetizado por la célula epitelial, se localiza en la membrana baso lateral desde donde puede unirse a la IgAd sintetizada por las células plasmáticas en la lámina propia. Para ser endocitado y transportado por transcitosis a la cara apical (Michaelsen et al; 2017).

El dominio citoplásmico del pIgR contiene señales para su transporte al trans Golgi y a la cara baso lateral, localizadas en un segmento de 17 residuos de aminoácidos (Figura 5). La unión del complejo IgAd con el pIgR se da por interacción covalente al extremo del dominio Cα2 de uno de los monómeros y el otro extremo interacciona de forma no covalente con la cadena J y uno de los dominios Cα3 de la cadena pesada (Johansen & Kaetzel; 2005).

El inicio de la interacción IgA-pIgR requiere de los primeros tres dominios del pIgR (D1 a D3); mientras que D4 y D5 contribuyen indirectamente a la afinidad de la interacción (Figura 6). D1 es crítico para establecer uniones no covalentes entre los residuos treonina 27 (Thr27) a la treonina 33 (Thr33) y ácido glutámico 53 (Glu53) al ácido glutámico 54 (Glu54) con el dominio Cα3 y la cadena J (Johansen et al; 2001). Estas interacciones no covalentes entre el D1 del pIgR y la región Fc de la IgA inician la asociación y la subsecuente formación de la unión covalente que se da entre la cisteína 311 (Cys311) del dominio Cα2 y la cisteína 467 (Cys467) del D5 (Johansen et al; 2000).

Una vez unido a su ligando la transcitosis del pIgR inicia por la internalización desde la cara baso lateral, donde el proceso se regula por la actividad de dos señales de endocitosis rápida por la fosforilación en los residuos tirosina 734 (Tyr734) y serina 726 (Ser726) del propio receptor (Figura 5) junto con la participación de la tirosina cinasa p62Yes que permite la dimerización de dos complejos pIgR vía proteína G para la internalización del complejo; y la participación de la fosfolipasa C (PLC) que produce inositol trifosfato (I₃P) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros, a partir de 4,5 di fosfato, para la liberación final de calcio por calmodulina y la proteincinasa C (PKC) (Wu et al; 2017), respectivamente, para llevar a cabo la endocitosis.

El transporte vesicular puede darse en ambas direcciones y está mediado por la actividad de clatrina. El tránsito de los endosomas tempranos a los endosomas de reciclaje apicales depende de la participación de los microtúbulos de la célula plasmática (Johansen & Kaetzel; 2011).

Finalmente, los endosomas de reciclaje arriban a la superficie celular y se lleva a cabo la escisión del pIgR para la formación del componente secretor, que se libera en el medio apical, por la acción de enzimas serinproteasa que se expresan cerca de la cara apical del epitelio (Figura 6) (Ratajczak et al; 2010).

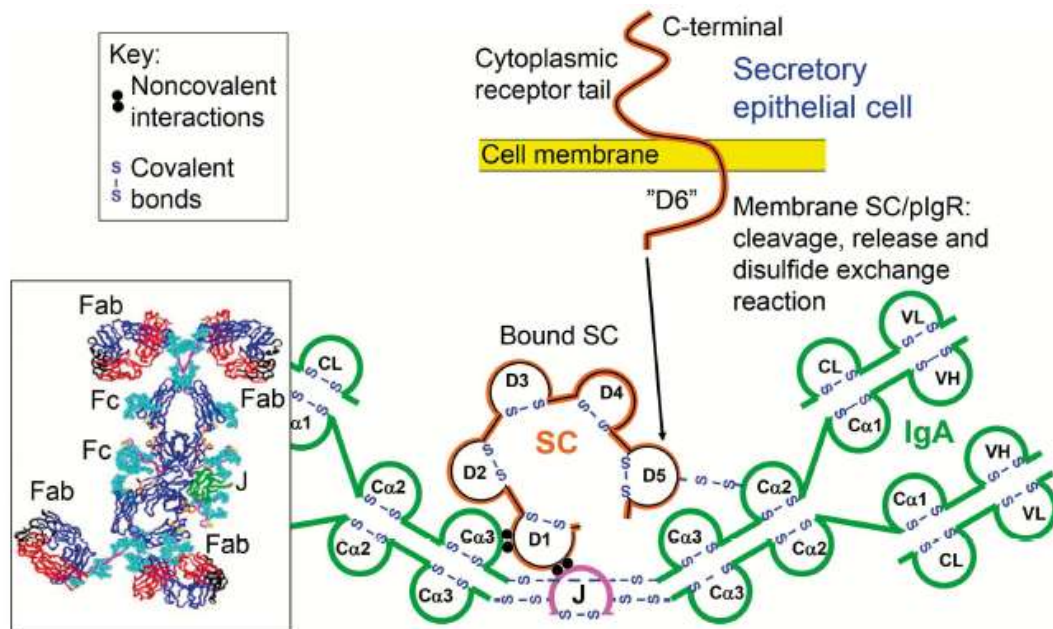


Figura 6. Estructura del complejo de la IgA secretora. En la Figura se muestran los componentes de la IgAS esquematizando las principales interacciones (puntos negros=interacciones no covalentes), s-s azules=interacciones covalentes o puentes disulfuro) entre sus principales componentes: monómeros de IgA (verde), cadena J (rosa) y componente secretor (rojo) con sus respectivos dominios tipo inmunoglobulina en cada uno de estos. El esquema muestra la distribución propuesta de acuerdo con datos obtenidos de estudios de cristalografía (parte inferior izquierda) donde se muestran ambos monómeros de IgA unidos por cadena J en su región Fc (ver texto) y la conformación tridimensional que adoptaría en SC por mayor estabilidad molecular, una vez que ha sido escindido el pIgR entre sus dominios D5 y "D6" de la membrana de la célula epitelial (amarillo) (Brandtzaeg; 2013).

El SC también puede ser transportado a través de la célula epitelial sin la necesidad de unirse con su ligando (Brandtzaeg; 2013) y secretarse de forma libre a la luz de los epitelios (Macpherson; 2008). Para unirse de forma

inespecífica a residuos de carbohidratos en la superficie de microorganismos neutralizando su capacidad de interaccionar con el epitelio (Yoo & Morrison; 2005) e interaccionar con las mucinas presentes en el moco y a su vez con diferentes microorganismos, para que estos sean arrastrados por el movimiento ciliar (Johansen et al; 2000) (Brandtzaeg; 2013).

1.8 Funciones de la IgA

La importancia y el papel de la IgA, radica en la defensa de las mucosas frente a microorganismos patógenos (Woof & Russell; 2011) y en el mantenimiento de la homeostasis con la microbiota normal y en condiciones normales; a través de los procesos considerados, de manera general, como no inflamatorios comparados con la respuesta sistémica humoral con la IgG y la IgM (Strugnell & Wijburg; 2010).

El primer mecanismo y el más conocido en la función efectora de la IgA es el que se conoce como exclusión inmune. A través del cual la IgA presente en el lumen mucosal, puede interaccionar con antígenos, ya sea a través de la red epítipo/parátipo o por sus residuos de glicosilaciones para unirse con moléculas en la superficie de los microorganismos (Woof & Russell; 2011).

Estas interacciones resultan en impedimentos estéricos que, por el volumen y complejidad de la IgAS adherida al antígeno, no le permite interaccionar con los receptores expresados en la superficie de las células epiteliales de la mucosa (como por ejemplo el gangliósido GM1); y evitar la interacción e invasión del patógeno a la mucosa (Okai et al; 2016) (Hoffman et al; 2016).

Algunos microorganismos son capaces de atravesar los mecanismos de barrera, propios de la respuesta innata y llegar a interaccionar con el epitelio. Ya sea por los mecanismos propios del patógeno o por la respuesta del epitelio, estos microorganismos pueden ser endocitados, aumentando el riesgo de una invasión. El segundo mecanismo en las funciones de la IgA se conoce como neutralización intracelular (Strugnell & Wijburg; 2010).

En este mecanismo de neutralización, la IgAd liberada en la lámina propia interacciona con el pIgR para iniciar la transcitosis a través de la célula epitelial. Los endosomas donde es acarreada la IgAd, se unen a los endosomas que

proviene de la superficie apical y que contienen a los antígenos que fueron endocitados por la propia célula epitelial. Esto permite que la IgA interacte con su antígeno y lo obligue a ser transportado hacia la luz mucosal (Johansen & Kaetzel; 2011). Se cree que este mecanismo de neutralización también está implicado en la disminución de la capacidad de ciertos virus para replicarse (Sealy et al; 2017).

El último mecanismo descrito para la IgA en mucosas se conoce como excreción antigénica. En este modelo se propone que algunos antígenos capaces de atravesar el epitelio y llegar a la lámina propia puedan ser captados por la IgA recién sintetizada y liberada por la célula plasmática. Esta IgA interactúa con el pIgR y se lleva a cabo su transcitosis acarreando al antígeno desde la cara baso lateral hacia el exterior, evitando una respuesta inmunológica exacerbada (Strugnell & Wijburg; 2010).

Durante la transferencia materna, la IgAS materna que ha llegado al intestino del neonato, facilita la captación y el procesamiento de antígenos por las células presentadoras, estimula la respuesta inmunológica, educa al sistema inmunológico del neonato para disminuir el riesgo de generar respuestas autoinmunes (mediante el sistema idiotipo-antiidiotipo) (Siegrist; 2003) (Joakim et al; 2017), disminuyendo las respuestas pro inflamatorias, induciendo la tolerancia a antígenos alimenticios y para antígenos de microorganismos comensales que inician su colonización en la mucosa (Chu et al; 2017) (Yamada et al; 2017).

Los estudios de transferencia materna en modelos porcinos han determinado que la vacunación y/o la interacción antigénica durante el embarazo, tienen un impacto en los niveles de inmunoglobulinas que la madre brinda a sus crías en la lactancia (Guzmán-Bautista; 2013); con la limitante de que el modelo presenta una placenta epiteliocorial, lo que limita las comparaciones con el ser humano.

En estudios clínicos que evalúan el efecto que la vacunación tiene durante el embarazo en los niveles de IgA total en calostro, reportan diferentes comportamientos; dependiendo de la naturaleza antigénica (Kitaura et al; 2017),

la edad a la cual se lleve a cabo el reto antigénico y la vía de administración (Demirjian & Levy; 2009). Este tipo de estudios donde se realice la cuantificación diferencial de los subtipos de IgA en humanos son muy escasos (Pakkanen et al; 2010) (Kitaura et al; 2017).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La transferencia pasiva de anticuerpos al recién nacido por medio de la lactancia materna es muy importante durante esta etapa de la vida. El calostro es la principal fuente de la IgA. Una vez transferida al recién nacido, la IgA juega un papel clave en la protección del tracto gastrointestinal y en las vías respiratorias altas a través de la exclusión inmune y en la homeostasis con la microbiota.

Por estudios epidemiológicos en humanos se ha demostrado que un aumento en la susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas está relacionado con una disminución de los niveles de IgA sérica.

Diferentes trabajos han evaluado el efecto de los episodios infecciosos o de protocolos de vacunación durante el embarazo, con los niveles de IgA total en calostro. En la mayoría de estos, no se encuentran diferencias entre los niveles de IgA total en mujeres sanas y con infecciones. Sin embargo, estos estudios no abordan la cuantificación diferencial entre los subtipos IgA1 e IgA2 en esta secreción con los casos de episodios infecciosos durante el embarazo. En México no se cuenta con trabajos de este tipo en población abierta.

Esto sería importante para poder entender mejor el efecto de las inmunizaciones e infecciones durante el embarazo y en el proceso de protección del recién nacido.

3. HIPÓTESIS

Las mujeres con mayor incidencia de enfermedades infecciosas durante el embarazo presentarán niveles más altos de IgA1 o IgA2 en calostro.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la asociación entre incidencia de enfermedades infecciosas durante el embarazo con los niveles de IgA (IgA1 e IgA2) en calostro.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1 Obtener las muestras de calostro, separar la fracción proteica y cuantificar la cantidad de proteínas totales presentes antes y después de su almacenamiento.

4.2.2 Cuantificar y determinar la proporción de IgA1 e IgA2 totales y asociadas al componente secretor (SC) en las muestras de calostro por ELISA cuantitativa.

4.2.3 Identificar a las pacientes con infecciones recurrentes y sin infecciones durante el embarazo para asociarlos con los niveles de IgA1 e IgA2 en calostro.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental utilizada se describe a continuación (Figura 7):

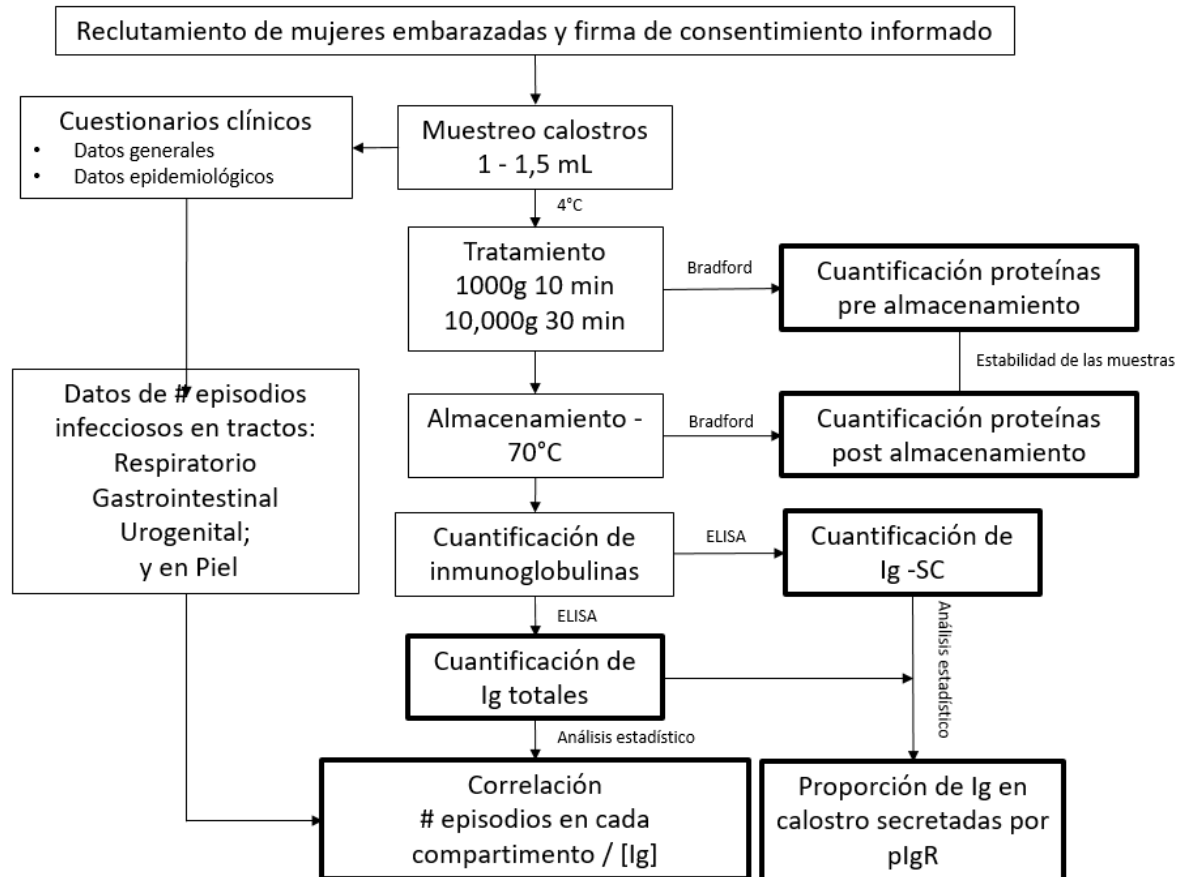


Figura 7. Estrategia experimental para determinar de la correlación de [Ig] en calostro con el número de infecciones durante el embarazo. Abreviaturas SIM= sistema inmunológico de mucosas, Ig= inmunoglobulinas, pIgR= receptor de inmunoglobulinas poliméricas, SC= componente secretor, °C= grado centígrado, min= minutos.

5.1 Selección de la población

El presente trabajo consistió en un estudio analítico, observacional de casos y controles. La selección de la población se llevó a cabo a través de un proceso aleatorio simple: Se reclutaron mujeres que acudieron a la atención de su parto en el Hospital Regional 1° de octubre (HR 1° de octubre) del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), en el

Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca (HRAEI) y en el Hospital de la Mujer (HM) de la Ciudad de México.

El cálculo de la n se determinó considerando que, en México, específicamente en la Zona Metropolitana del Valle de México, se registraron 879,212 nacimientos entre el segundo semestre de 2016 y el primer semestre de 2017; de acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) 2017, Se consideró un intervalo de confianza de 95 %, permitiendo un error del 5 %. Se tomó un valor de recurrencia de $p= 56,6 \%$, donde p se refiere a la incidencia de enfermedades infecciosas padecidas por mujeres durante el embarazo. Utilizando la fórmula para el cálculo de n,

$$n = \frac{Z^2 p^2}{e^2}$$

Dónde: n es el número de muestra calculado con valor de 499,25

Z es el nivel de confianza, el cual se consideró con 95 % (1,96)

p es la probabilidad de presentar enfermedades durante el embarazo con valor de 56,6 % o 57 %

e error de estimación dispuestos a aceptar para 95 % o sea 5 %

5.2 Criterios de inclusión

Se consideraron mujeres de cualquier edad, con un embarazo a término (38-42 semanas de gestación), por parto fisiológico (F) o quirúrgico programado (QX), que hayan ido con regularidad a su atención médica para el seguimiento de su embarazo, con parto de producto único y que aceptaron participar en el proyecto.

5.3 Criterios de exclusión

No se incluyeron mujeres que, por algún motivo, se encontraran imposibilitadas para la lactancia materna, que se encontraran en tratamiento farmacológico hormonal o con problemas hormonales; y que por alguna razón no decidieran

seguir en el estudio o que refirieran alguna enfermedad aguda en las últimas 3 semanas previas al parto.

5.4 Muestreo

Previo a su parto, a las pacientes que aceptaron participar en el estudio, se les entregó un consentimiento informado (Ver anexos), el cual leyeron y firmaron de acuerdo con el tratado de Helsinki, la ley general de salud vigente (LGS) y el comité de ética de cada Hospital.

Se les entregó un cuestionario, el cual llenaron con sus datos generales e información sobre las enfermedades y número de episodios infecciosos que habían padecido durante su segundo y tercer trimestre del embarazo, de acuerdo al tipo de compartimento al que estuvieron asociadas las infecciones (tracto respiratorio, gastrointestinal, urogenital y piel) (Ver anexos). Los datos facilitados por las pacientes fueron corroborados con la historia clínica facilitada por el médico de cabecera.

Dentro de las primeras 72 horas del nacimiento de su hijo/a, se llevó a cabo el muestreo según lo descrito en la técnica de extracción de leche en las clínicas de lactancia en Hospitales Infantiles y Generales (SinDis):

- a) Estimulación; masaje en varias zonas del seno con movimientos circulares por pocos segundos empezando en la parte superior y continuando en espiral hasta la areola.
- b) Preparación; limpieza de la zona con solución inyectable, jabón y gasas estériles de forma circular desde el pezón hacia la periferia. Se tomó en cuenta obtener la muestra del seno que no había usado durante la última alimentación de su hijo/a y respetando un tiempo de diferencia entre alimentaciones de cómo mínimo 2 horas si no fue la primera secreción posparto.
- c) Extracción; se colocan dedos índice, medio y pulgar a unos 3 o 4 centímetros detrás del pezón formando una letra “C” con los dedos, empujar hacia la caja torácica con movimientos suaves pero firmes hasta la eyección del calostro.

- d) Transporte; Las muestras se colectaron en tubos *Eppendorf*® de 1,5 mL y se mantuvieron a 4 °C para su traslado desde los respectivos hospitales hasta el laboratorio para ser procesadas.

5.5 Separación de proteínas

Para la obtención de proteínas, las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. Se obtuvieron 3 fases: a) una fase lipídica, en parte superior; b) una fase acuosa en la parte media y c) componentes celulares en la parte inferior. La fase acuosa se separó tratando de no arrastrar los restos de la fase superficial ni los componentes celulares, estas últimas fases fueron desechadas.

Para asegurar una mejor separación, la fase acuosa obtenida se llevó a una segunda centrifugación a 10 000 g durante 30 minutos a 4°C ambos ciclos en una centrífuga *Allegra X-22 Series Beckman Coulter*® USA. La fase obtenida al final se guardó en alícuotas a -70°C hasta el momento de su uso.

5.6 Cuantificación de proteínas

En cajas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano *Thermo scientific*® *MaxiSorp USA Lote 1132249* se colocaron 10 µL de las muestras de calostro en proporción 1:1 en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH=7,4 (Ver anexos) de acuerdo con el diseño de placa (Figura 8). Para la curva estándar se preparó una solución de albúmina sérica bovina (*bovine seric albumin (BSA) Equitech-bio, inc*® USA) en agua destilada (64 mg/mL) y, a partir de esta, se realizaron diluciones dobles seriadas, se colocaron 10 µL de cada dilución correspondiente en los pozos destinados para la curva estándar.

Se incorporaron pozos control para las muestras donde sólo se colocaron 10 µL de PBS y pozos control para la curva estándar donde sólo se colocaron 10 µL de agua destilada (Figura 8). Posteriormente, a todos los pozos se les adicionaron 200 µL de reactivo de Bradford diluido (1 parte de reactivo con 4 partes de agua destilada) y la placa se dejó incubando 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo la placa se leyó en un espectrofotómetro (*Sunrise absorbance reader, Tecan's Magellan*® *universal*

reader broad wavelength range – from 340 to 750 nm) a una longitud de onda de 590 nm.

El punto de corte se calculó, tanto para la curva estándar como para las muestras, calculando el promedio de los respectivos controles más 3 desviaciones estándar ($\text{media}+3\sigma$)_{curva} y ($\text{media}+3\sigma$)_{muestras}. Estos valores se restaron a las absorbancias de la curva y de las muestras, respectivamente, para obtener los valores netos (valores netos_{curva} y valores netos_{muestras}) (Figura 8).

Con los valores netos_{curva} se obtuvo, por regresión lineal, la fórmula de la recta $y=mx+b$ y la correlación; donde se consideró un valor aceptable o adecuado cuando $r^2 \geq 0,96$. Tomando en cuenta los factores de dilución y mediante la interpolación algebraica de los valores netos_{muestras} con la fórmula de la recta obtenida se calculó la cantidad de proteínas totales en mg/mL.

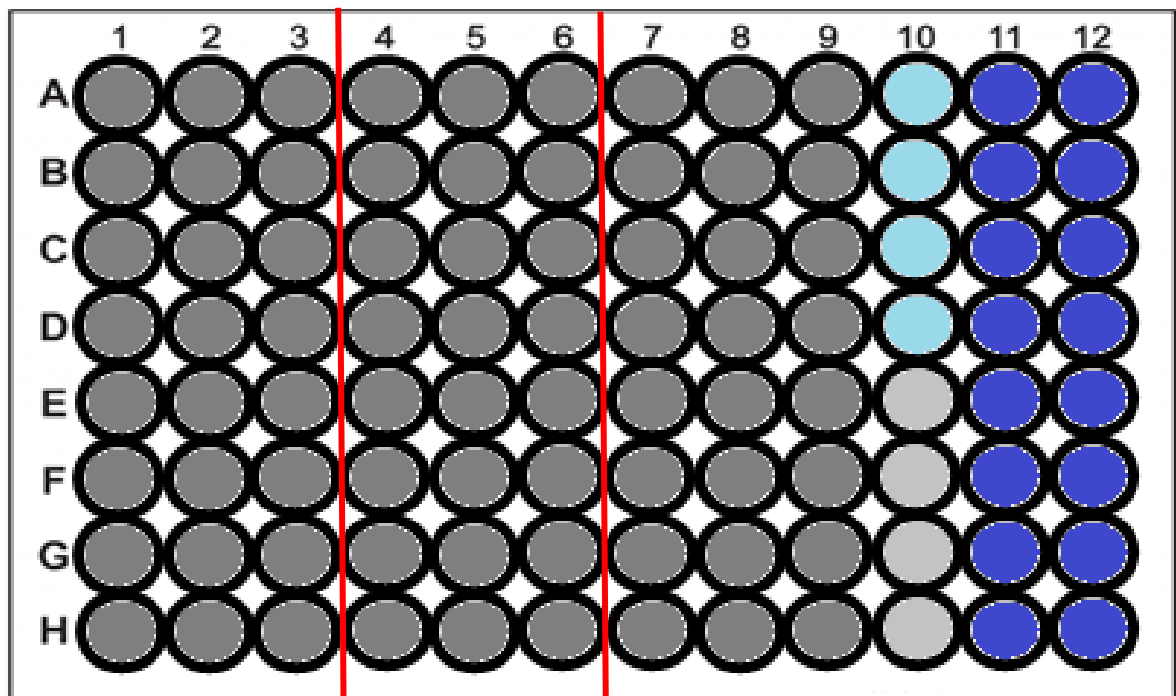


Figura 8. Diseño de placa para la cuantificación de proteínas. Pozos azul oscuro= Curva de estándar, Pozos azul celeste= Controles de curva estándar, Pozos gris= Muestras a dilución correspondiente (ver texto), Pozos gris claro= Controles de muestras. Las líneas rojas representan la división utilizada para distribuir las muestras con 3 repeticiones por muestra. En cada placa caben hasta 24 muestras diferentes.

5.7 Cuantificación de inmunoglobulinas totales

Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano *Thermo scientific® MaxiSorp USA Lote 1132249* con 100 µL de anticuerpo monoclonal de ratón [7A09] anti cadena ligera humana ($\kappa+\lambda$) *abcam 1942 (Anti-human Ig light chain antibody [7A09] ab1942 Cambridge UK)*, a una concentración de 1µg/mL en PBS, durante un tiempo de incubación de 12 horas a 4°C.

Pasado este tiempo se realizaron 5 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % (Ver anexo). El bloqueo se llevó a cabo con 200 µL por pozo de BSA al 5 % en PBS (Ver anexo) para IgG e IgM y PBS-Tween20 0,05 % para IgA1 e IgA2 durante 90 min a 25 °C.

Se realizaron 3 Lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % en todos los isotipos. Para el desarrollo de la curva estándar se adicionaron 100 µL por pozo de las soluciones estándar preparadas a partir de reactivos comerciales de inmunoglobulinas humanas purificadas: IgA1 (*Natural human protein IgA1 ab91020*), IgA2 (*Natural human protein IgA2 ab91021 Cambridge UK*), IgM (*Natural human IgM from colostrum*) purificada humana e IgG (*Natural human IgG from colostrum Cambridge UK*) a concentraciones decrecientes en PBS, de acuerdo con el diseño de placa (Figura 9). Para las muestras se adicionaron 100 µL por pozo de diluciones 1: 100, 1: 1000 y 1: 10,000 de calostro humano en PBS durante un tiempo de incubación de 2 horas a 37°C.

Pasado este tiempo, se realizaron 5 lavados con 200 µL por pozo de PBS-Tween20 0,05 % para todos los pozos destinados a la determinación de IgG e IgM y 8 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % para los pozos destinados a la determinación de IgA1 e IgA2. Posteriormente, para la detección de isotipos se adicionaron 100 µL por pozo de anticuerpos biotinilados, de acuerdo con el diseño de placa (Figura 9):

a) Para la detección de IgA en calostro, se adicionó un anticuerpo policlonal de conejo acoplado a biotina en su región Fc anti IgA humana ab97218 (*Rabbit*

polyclonal ab97218 Cambridge UK Anti-human IgA alpha chain (Biotin)) en una dilución de 1: 10,000.

b) Para la detección de IgA1 en calostro, se adicionó un anticuerpo monoclonal de ratón acoplado a biotina en su región Fc anti IgA1 humana (*Mouse monoclonal B3506B4 Cambridge UK Anti-human IgA1 Fc (Biotin) ab99796*) en una dilución de 1:2000.

c) Para la detección de IgA2 en calostro, se adicionó un anticuerpo monoclonal de ratón acoplado a biotina en su región Fc anti IgA2 humana (*Anti-IgA2 antibody [A9604D2] Cambridge UK (Biotin) ab128731*) en una dilución de 1:1000.

d) Para la detección de IgM en calostro, se adicionó un anticuerpo policlonal de cabra acoplado a biotina en su región Fc anti IgM humana (*Anti-human IgM mu chain (Biotin) Cambridge UK ab49655*) en una dilución de 1: 20,000.

e) Para detección de IgG en calostro, se adicionó un anticuerpo monoclonal de cabra acoplado a biotina en su región Fc anti IgG humano (*Goat anti-human IgG Biotin conjugated 81245062 Zymax*) en una dilución de 1: 30,000.

Todos los pozos se incubaron durante 1 hora a 37°C. Concluido el tiempo se realizaron 5 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % para todos los pozos destinados a la determinación de IgG e IgM y; 8 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % para los pozos destinados a la determinación de IgA1 e IgA2.

Finalmente se adicionaron 100 µL por pozo de una dilución 1:5000 de complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (*Streptavidin HRP ab7403*), y se dejó incubando durante 1 hora a 37°C.

Terminado el tiempo se realizaron 5 Lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 %. Para el revelado se utilizaron 100µL por pozo de 3'3"-5-5-tetrametil bencidina (TMB) con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (*TMB ELISA substrate high sensitivity abcam 171523 Cambridge UK*) se incubó en un intervalo de entre 5 a 10 min. La reacción se detuvo con la adición de 100µL de H₂S0₄ 0,2 M, las

placas se leyeron en el espectrofotómetro (*Sunrise absorbance reader, Tecan's Magellan® universal reader*) a 450 nm.

De acuerdo con el diseño de placa (Figura 9), se incorporaron pozos control para las muestras, donde se colocaron 100 µL de PBS en el momento de la adición de las muestras. Y pozos control para la curva estándar, donde sólo se colocaron 100 µL de *buffer* de dilución en el momento de:

- a) La adición del anticuerpo de sensibilización*; este pozo se denominó como pozo control sin anticuerpo anti cadenas ligeras o de captura (pozo sin/cap);
- b) La adición del anticuerpo de detección*; este pozo se denominó como pozo control sin anticuerpo anti isotipo unido a biotina (pozo sin/biot) y
- c) La adición del complejo de revelado*; este pozo se denominó como pozo control sin estreptavidina-HRP (pozo sin/HRP).

*Consultar cada paso correspondiente de la metodología descrita en este mismo apartado.

El cálculo del punto de corte, la obtención de los valores netos, la obtención de la fórmula de la recta a partir de los valores de absorbancia de la curva estándar y la interpolación de los datos se realizaron de la misma manera que lo descrito en el punto **5.6 Cuantificación de proteínas**.

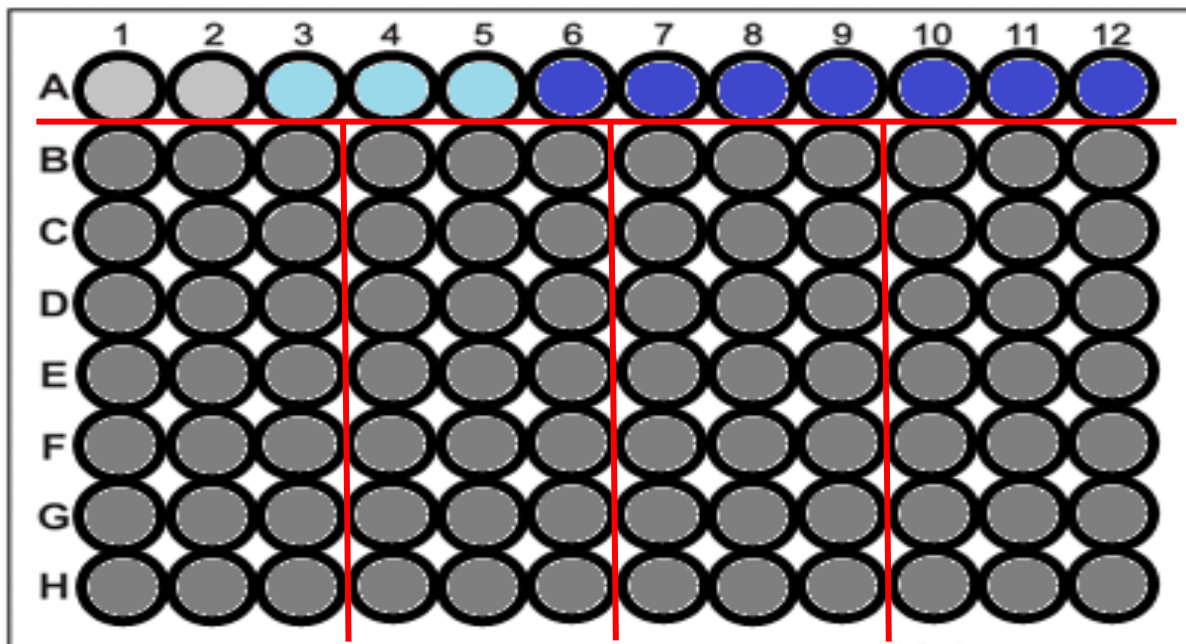


Figura 9. Diseño de placa para la cuantificación de inmunoglobulinas. Pozos azul oscuro= Curva de estándar, Pozos azul celeste= Controles de curva estándar, Pozos gris= Muestras a dilución correspondiente (ver texto), Pozos gris claro= Controles de muestras. Las líneas rojas representan la división utilizada para distribuir las muestras con 3 repeticiones por muestra. En cada placa caben 28 muestras diferentes. Se ocupó una sola placa por cada isotipo determinado (IgA, IgA-SC, IgA1, IgA2, IgM, IgM-SC, IgG, IgG-SC).

5.8 Cuantificación de inmunoglobulinas unidas a componente secretor (SC)

Para la detección de IgA unida a SC (IgA-SC), se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano, *Thermo scientific® MaxiSorp Lote 1132249*, con 100 μ L de anticuerpo monoclonal de ratón [3B7] anti cadena IgA humana abcam 7400 (*Anti-human IgA antibody [3B7] ab7400 Cambridge UK*) a una concentración de 1 μ g/mL en PBS.

Para la detección de IgM unida a SC (IgM-SC), se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con 100 μ L de anticuerpo monoclonal de ratón [IM206] anti cadena IgM humana ab200541 (*Anti-human IgM antibody [IM260] ab7400 Cambridge UK*) a una concentración de 1 μ g/mL en PBS.

Para la detección de IgG unida a SC (IgG-SC) se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con 100 μ L de anticuerpo monoclonal

de ratón [4D2D9G8] anti cadena IgG humana MA5-14755 (*Anti-human IgG antibody [4D2D9G8] MA5-14755*) a una concentración de 1µg/mL en PBS. Todos los anticuerpos tuvieron un tiempo de incubación de 12 horas a 4°C.

Pasado este tiempo se realizaron 5 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 %. Se llevó a cabo el bloqueo con 200 µL por pozo de BSA al 5 % en PBS para IgG e IgM y PBS-Tween20 0,05 % para IgA durante 1,5 horas a 25 °C.

Se realizaron 3 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % para todos los isotipos. Durante el desarrollo de la curva estándar se adicionaron 100 µL por pozo de soluciones estándar de IgA de calostro humano purificada (*Natural human protein IgA from colostrum I1010 25MG*), IgM (*Natural human IgM from colostrum*) purificada humana e IgG (*Natural human IgG from colostrum*) a concentraciones decrecientes en PBS.

Para las muestras se adicionaron 100 µL por pozo de diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000 de calostro humano en PBS, durante un tiempo de incubación de 2 horas a 37°C (Figura 9). Pasado este tiempo se realizaron 5 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % para todos los pozos destinados a la determinación de IgG e IgM y 8 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % para los pozos destinados a la determinación de IgA1 e IgA2.

Posteriormente, para la detección de inmunoglobulinas unidas a SC (Ig-SC) se adicionó anticuerpo biotinilado policlonal de cabra anti componente secretor (SC) LS-C185086 LSBio 100 µL por pozo a una dilución de 1:8000 durante 1 hora a 37°C. Concluido el tiempo se realizaron 5 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % para todos los pozos destinados a la determinación de IgG-SC e IgM-SC y 8 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0,05 % para los pozos destinados a la determinación de IgA-SC.

A partir de este punto, la metodología seguida fue la misma que la descrita en el apartado **5.7 Cuantificación de inmunoglobulinas totales**, tanto las condiciones de adición del complejo estreptavidina-HRP, las condiciones y el número de lavados; y el proceso de revelado.

Los cálculos de la cuantificación de Ig-SC en mg/mL presentes en calostro, a partir de los valores netos se realizaron igual que en el punto **5.7 Cuantificación de inmunoglobulinas totales.**

5.9 Tratamiento estadístico de los datos

Los datos obtenidos de la cuantificación de IgA1, IgA2, IgM e IgG totales, así como de IgA-SC, IgM-SC e IgG-SC fueron evaluados mediante la prueba de normalidad de *Kolmogórov-Smirnov*, para determinar diferencias estadísticamente significativas se utilizó la prueba de *U Mann-Whitney* para pruebas no paramétricas de 2 muestras independientes y la prueba de *Kruskal-Wallis* para pruebas no paramétricas comparando más de 2 muestras independientes. Finalmente, se utilizó el ensayo de correlación de *Pearson* para determinar la naturaleza de la asociación entre la concentración de inmunoglobulinas presentes en las muestras obtenida por ELISA y el número de episodios infecciosos durante el embarazo que se refirieron en los cuestionarios. En todos los casos se hizo uso del programa *GraphPad Prism® versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com*.

6. RESULTADOS

6.1 La población de estudio consistió en mujeres de la Zona Metropolitana y de nivel socioeconómico medio bajo

En la tabla 1 se muestran las características descriptivas de las 500 pacientes incluidas en el estudio con los extractos derivados por las características de este estudio como se discutirá más adelante (Discusión de Resultados). Como se observa la edad de las madres varió entre los 14 hasta los 43 años con una media de 26 años. La gran mayoría de las pacientes son de la Zona Metropolitana del Valle de México y el resto de las pacientes fueron del estado de Morelos.

La distribución del número de mujeres que tuvieron a sus hijos por parto fisiológico (F) fue ligeramente mayor sobre madres que tuvieron su parto por cirugía, también conocida como quirúrgica (QX). Finalmente, la distribución por número de parto, es decir, madres que fueron por atención para el nacimiento de su primer hijo (uníparas), segundo hijo (2 hijos), tercer hijo (3 hijos) o más de tres hijos (multíparas); fue disminuyendo conforme aumentaba el número de hijo, sin embargo, esta diferencia fue muy ligera entre todos los casos sin alcanzar la significancia estadística.

Tabla 1. Características de la población de estudio

Característica (n= 500)	Promedio ± D.E. Número (%)
Edad (años)	26,67 ± 6,49
Mínima	14
Máxima	43
Origen	Zona Metropolitana 485 (97 %) Otros 15 (3 %)
Tipo de parto	Fisiológico 285 (57 %) Quirúrgico* 215 (43 %)
Distribución por número de parto**	Uníparas 27 % 2 hijos 26 % 3 hijos 24 % Multíparas 23 %

En la tabla 2 se muestra la distribución de la población de estudio con respecto al nivel socioeconómico que refirieron las pacientes al momento de la selección para participar en el estudio. Las mujeres refirieron la cantidad de ingresos en el domicilio en el cual ellas residían en ese momento. Como se observa, la mayoría de las mujeres que participaron en el estudio pertenecen al nivel socioeconómico medio bajo, seguido por mujeres de clase media y al final, extractos sociales más bajos.

Tabla 2. Distribución de la población de estudio de acuerdo con el nivel socioeconómico

Clase (Nivel de ingresos/mes)	Número (%)
Media \$ 11,600-35,000	66 (13,2 %)
Media baja \$ 6,800-11,600	394 (78,8 %)
Baja alta \$ 2,700-6,800	35 (7 %)
Baja baja \$ 0-2,700	5 (1 %)

6.2 La concentración de proteínas en calostro es de 43,91 mg/mL

La cantidad de proteínas en los 500 calostros analizados se obtuvo un promedio de 43,91 mg/mL (Figura 10A). Ya que el muestreo de los calostros se extendió durante cerca de 10 meses hasta alcanzar las 500 muestras de acuerdo a la estimación de la n. Fue necesario asegurar que las muestras que se tomaron al inicio del proyecto y, que por consiguiente tuvieron un tiempo de almacenamiento mucho más prolongado que las muestras que se obtuvieron al final del proyecto; la concentración de proteínas no se había afectado por las condiciones de almacenamiento (-70 °C). Por lo cual, al finalizar la segunda centrifugación durante el tratamiento de las muestras se utilizó una pequeña

cantidad de estas para realizar una primera cuantificación de proteínas (a esta serie de datos se les conoció como cuantificación de proteínas en muestras de calostro “antes del almacenamiento”) y el resto del volumen se almacenó hasta el momento de la cuantificación de Ig (de acuerdo con Materiales y Métodos). Además, el día de la cuantificación de inmunoglobulinas se realizó una segunda cuantificación de proteínas (a esta serie de datos se les conoció como cuantificación de proteínas en muestras de calostro “después del almacenamiento”). En la Figura 10B se muestra el valor de correlación obtenido de $r^2= 0,9682$ en la comparación de ambos conjuntos de datos.

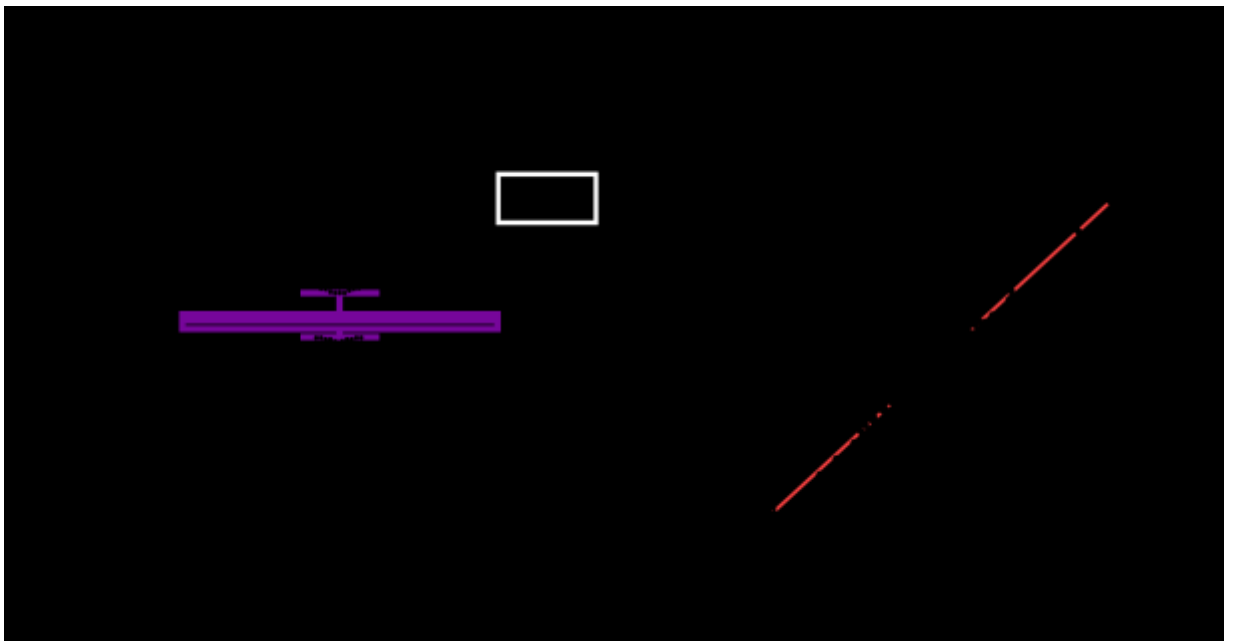


Figura 10. Cuantificación de proteínas en calostro no se afecta por el almacenamiento. En 10A se muestra en grafico de caja (percentil 25, media, percentil 75) y bigotes (mínimo y máximo) la cantidad de proteínas en los 500 calostros. Con un valor promedio de 43,91 mg/mL, una desviación estándar de 3,553, percentil 25= 41,71, percentil 75= 45,11. En 10B se muestra a través de un gráfico de puntos el ensayo de correlación entre el conjunto de datos que corresponde a la cuantificación de proteínas antes del almacenamiento y el conjunto de datos que corresponde a la cuantificación de proteínas después del almacenamiento, se incluye el valor de r^2 y con una línea recta la pendiente de la curva (rojo).

6.3 La cantidad de IgA2 es ligeramente mayor que la de IgA1 en una proporción de 1,28 en el calostro

En la cuantificación de inmunoglobulinas por ELISA, se realizó la determinación de los subtipos de interés IgA1 e IgA2 y se integró la cuantificación de IgM e IgG como referencia, ya que se ha reportado que sus valores son muy bajos en calostro; se consideraron isotipos totales e isotipos asociados a componente secretor (Figura 11). En la Figura 11 se muestran, en un gráfico de caja y bigotes, los valores de IgA total (IgAt), IgA1, IgA2, IgM e IgG en calostro.

De acuerdo con los resultados, se obtuvieron valores promedio de $24,83 \pm 3,43$ mg/mL de IgA t, $10,00 \pm 1,50$ mg/mL de IgA1, $12,83 \pm 3,01$ mg/mL de IgA2, $1,51 \pm 0,87$ mg/mL de IgM y $2,64 \pm 0,77$ mg/mL de IgG en calostro. Esto se refleja en que el 56,2 % de la IgA total es IgA2 mientras que la IgA1 representa en un 43,8 %. Ambos subtipos se encuentran en una relación IgA2/IgA1 de 1,28.

6.4 La mayor parte de la IgA y toda la IgM presentes en calostro se transportan por transcitosis a través del plgR

Al mismo tiempo se llevó a cabo la cuantificación de inmunoglobulinas asociadas a SC. Como se observa en la Figura 11, la cantidad de IgAS es de $22,53 \pm 3,11$ mg/mL, $1,50 \pm 1,64$ mg/mL es de IgM secretora (IgMS) y no se detectó IgG secretora (IgGS) en calostro. Esto refleja que el 90,74 % de la IgAt, el 99,09 % de la IgM y 0,00 % de la IgG detectadas en calostro están asociadas al componente secretor.

Concentración de Ig en calostro en la población total

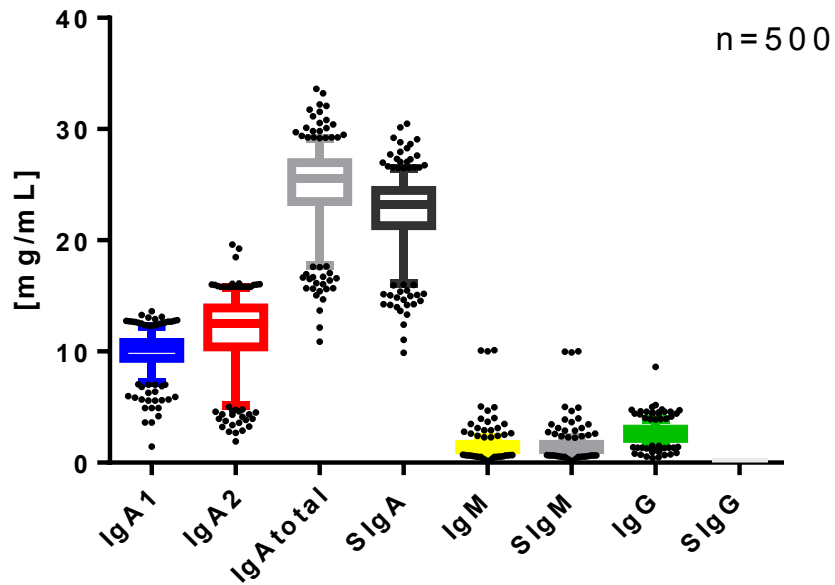


Figura 11. Cuantificación de IgA1, IgA2, IgM e IgG totales y asociadas al componente secretor (SC). En el gráfico de caja (percentil 25, media, percentil 75) y bigotes (mínimo y máximo) se muestran los valores obtenidos de las cuantificaciones de IgA1 (azul) percentil 25= 9,38, media= 10,00±1,50, percentil 75= 10,82; IgA2 (rojo) percentil 25= 10,41, media= 12,83±3,01, percentil 75= 13,93; IgA total (gris) percentil 25= 23,49, media= 24,83±3,43, percentil 75= 26,97; IgA unida a componente secretor o IgA secretora (negro) percentil 25= 21,32, media= 22,53±3,11, percentil 75= 24,47; IgM (amarillo) percentil 25= 1,18, media= 1,50±0,86, percentil 75= 1,65; IgMS (gris oscuro) percentil 25= 1,17, media= 1,50±0,86, percentil 75= 1,64; IgG (verde) percentil 25= 2,17, media= 2,64±0,77, percentil 75= 3,03; e IgGS (gris claro) percentil 25= 0,00, media= 0,00±0,00, percentil 75= 0,00; para 500 muestras de calostro.

6.5 Los datos de la cuantificación de todas las inmunoglobulinas en el calostro describen una distribución no normal

Para poder determinar el tipo de pruebas estadísticas adecuadas a utilizar en el análisis se determinó la naturaleza de distribución de los datos en el calostro de las 500 pacientes separando a las mujeres que no refirieron ninguna enfermedad durante su embarazo (sanas) y mujeres que refirieron al menos un episodio infeccioso. En la Figura 12 se muestran los histogramas obtenidos del número de mujeres sanas y con episodios infecciosos, en función de la cantidad

de inmunoglobulina IgA1, IgA2, IgM e IgG. De manera cualitativa se observa que todos los isotipos en ambas variables presentaron una distribución no normal, lo cual fue verificado por la prueba de *Kolmogórov-Smirnov*.

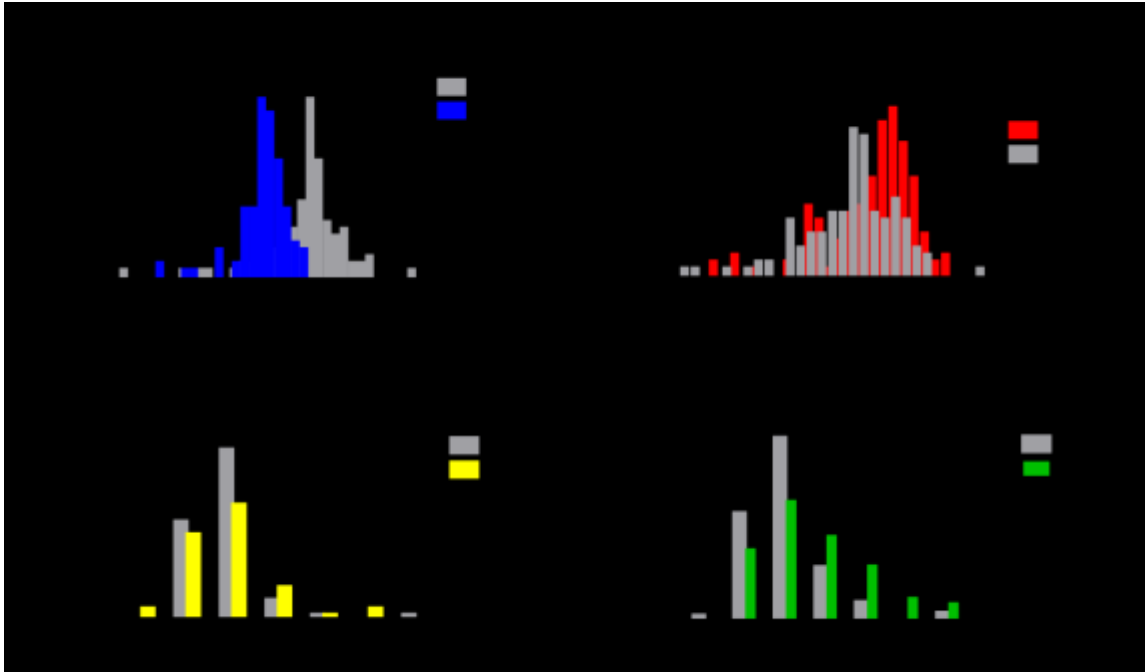


Figura12. Distribución de datos para IgA1, IgA2, IgM e IgG en el calostro entre mujeres sanas y mujeres con al menos un episodio infeccioso. En los histogramas se muestran los datos de frecuencia para determinar la naturaleza de la distribución de los datos para IgA1 (Fig. 12A) de mujeres con episodios infecciosos en barras grises y sanas en barras azules, para IgA2 (Fig. 12B) de mujeres con episodios infecciosos en barras grises y sanas en barras en rojo, para IgM (Fig. 12C) de mujeres con episodios infecciosos en barras grises y sanas en barras amarillas y para IgG (Fig.12D) de mujeres con episodios infecciosos en barras grises y sanas en barras color verde; para 500 muestras de calostro. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de *Kolmogórov-Smirnov*, no se encontró significancia estadística para ningún caso.

6.6 Los niveles de IgA1 e IgA2 en el calostro no varían entre los tipos de parto, edades de las madres ni por el número de hijos

Durante la caracterización de la población en función a las cantidades de Ig presentes en el calostro se evaluó si características como el tipo de parto, es decir, fisiológico o quirúrgico (Fig. 13A); si la edad de las madres, es decir, si entre el rango de edades desde 14 años hasta 43 existían diferencias en los valores de Ig (Fig. 13B) y si entre el número de hijos, es decir, madres uníparas y múltiparas (Fig. 13C) existían diferencias con respecto a la cantidad de IgA1

(azul), IgA2 (rojo), IgG (verde) o IgM (amarillo). En la comparación de la concentración de inmunoglobulinas por el tipo de parto se observa que para el caso de los niveles de IgA2 en calostro, aquellas mujeres que tuvieron a su hijo por parto fisiológico presentan niveles ligeramente más elevados que las mujeres que tuvieron a su hijo por parto quirúrgico, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa. En el caso del resto de los subtipos IgA1, IgM e IgG no se encontraron tendencias apreciables ni mucho menos diferencias significativas entre los grupos (Fig. 13A).

Para el caso de la comparación de los niveles de inmunoglobulina entre las diferentes edades de las madres (desde los 14 años hasta los 43) se detectó una tendencia en los niveles de IgA2 (rojo) a disminuir en función de la edad, mientras que para el caso de IgA1 (azul) a aumentar en función de la edad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, para el número de parto no se encontraron tendencias claras ni diferencias entre los niveles de inmunoglobulinas en calostro por el número de parto o primer hijo (uníparas), segundo hijo, tercer hijo o más de tres hijos (multíparas).

En todos los casos los niveles tanto de IgM como de IgG no muestran variaciones importantes en cada uno de los casos evaluados (Figuras 13A, 13B y 13C).

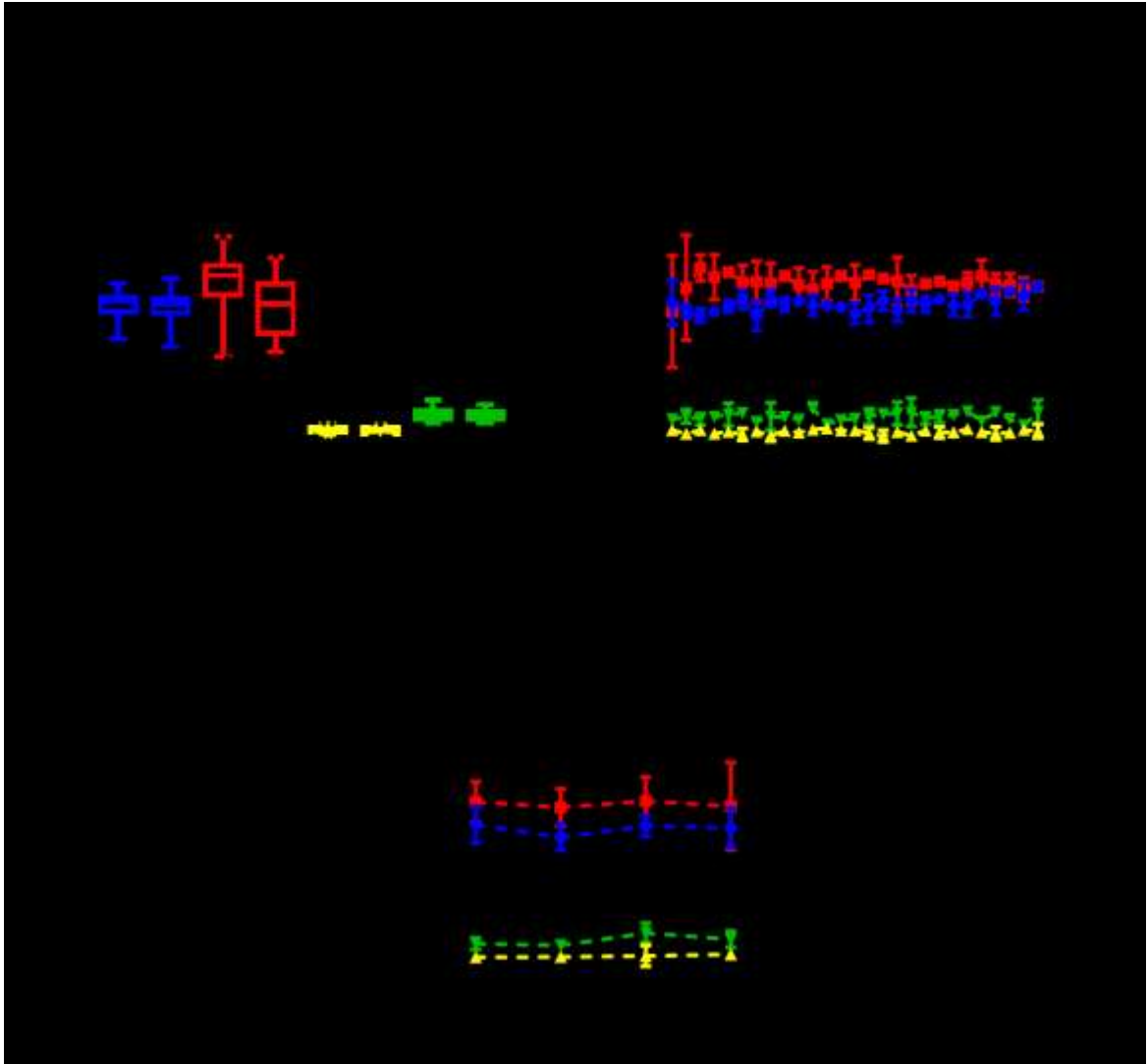


Figura 13. Estratificación de la población de estudio en función al tipo de parto, edad de la madre y número de parto. En la Fig. 13A se muestra en un gráfico de caja y bigotes la cuantificación de los niveles de IgA1 (azul), IgA2 (rojo), IgM (amarillo) e IgG (verde) comparado entre mujeres que tuvieron a su hijo por parto fisiológico y quirúrgico. En la Fig. 13B se muestra un gráfico de tendencia donde se muestra los niveles de IgA1 (azul), IgA2 (rojo), IgM (amarillo) e IgG (verde) comparado entre la edad de las mujeres (años). En la Fig. 13C se muestra un gráfico de tendencia donde se muestra los niveles de IgA1 (azul), IgA2 (rojo), IgM (amarillo) e IgG (verde) comparado entre el número de parto; 1 para madres que tuvieron a su primer hijo, 2 para madres que tuvieron a su segundo hijo, así y sucesivamente. Los resultados se muestran como la media \pm DE de al menos tres repeticiones. El análisis estadístico se realizó para 13A utilizando la prueba de *U de Mann-Whitney*. El análisis estadístico para 13B y 13C se realizó por prueba de rangos de *Kruskal Wallis*. No se encontró diferencia estadística para ningún caso, por lo cual ya no se realizaron las pruebas de múltiples comparaciones *post hoc* correspondientes.

6.7 Las mujeres que presentaron episodios infecciosos durante el embarazo presentan niveles aumentados de IgA1 y niveles disminuidos de IgA2 en calostro con respecto a las mujeres sanas

Una vez estratificada la población de estudio nos enfocamos en la determinación epidemiológica de la población de mujeres que presentaron episodios de enfermedades infecciosas asociadas a compartimentos mucosales (Tabla 3). Ya que este es el primer acercamiento a este fenómeno en humanos, nos enfocamos al estudio de la población que refirió al menos un episodio asociados a un sólo compartimento mucosal que constituyó una n=268.

Tabla 3. Cantidad de mujeres que presentaron episodios infecciosos en uno o más compartimentos mucosales durante el embarazo

Característica (n= 312)	Total
Mujeres con ≥ 1 enfermedad infecciosa en un sólo compartimento SIM	268
Mujeres con ≥ 1 enfermedad infecciosa de >1 compartimento SIM	44

En la Fig. 14 se muestra en porcentajes las incidencias de enfermedades asociadas a algún compartimento del SIM: el tracto respiratorio alto en café, tracto gastrointestinal en azul, la piel en verde y el tracto urogenital en rosa de las 268 mujeres que refirieron enfermedades en un solo compartimento mucosal. Se observa que las enfermedades urogenitales son las infecciones más recurrentes en la población con un 36,19 % de incidencia, seguidas por infecciones en tracto respiratorio (26,87 %), gastrointestinal (19,03 %) y piel (17,91 %).

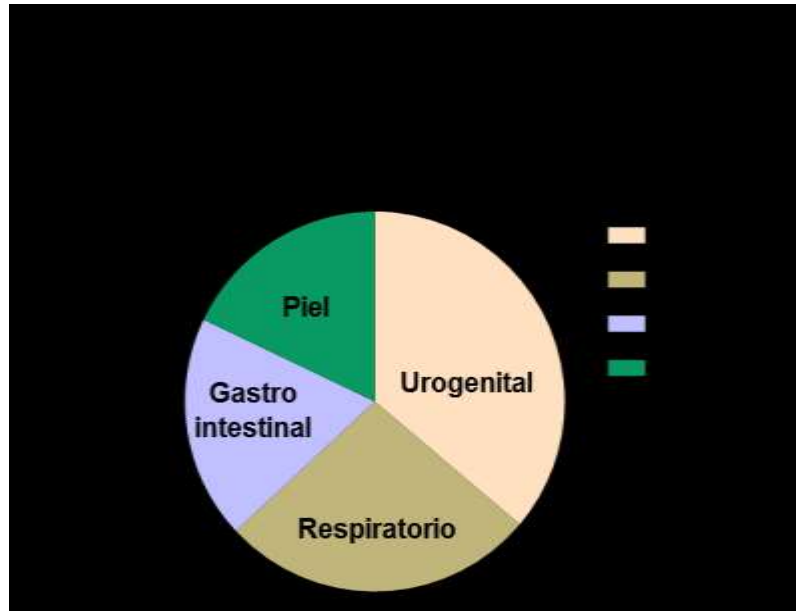


Figura 14. Porcentajes de infecciones asociadas a un compartimento mucosal. Gráfico de pastel donde se muestra la distribución de enfermedades asociadas a tractos urogenitales, respiratorios, gastrointestinales y en piel de 268 pacientes que refirieron episodios durante su embarazo.

Por el tipo de estudio y más aún por el tiempo considerado para el desarrollo del mismo, a partir de aquí sólo se utilizarán los datos de mujeres sanas $n=156$ y de mujeres con episodios infecciosos en un solo compartimento $n=268$. En la Figura 15 se muestran mediante percentiles los niveles de inmunoglobulina en porcentajes comparando la población que no refirió infecciones durante el embarazo o sanas (S) y la población que refirió al menos un episodio infeccioso durante el embarazo. Se observa que la distribución de los niveles de la IgA total (IgAt) no presentan diferencias entre el percentil 25 (p25), percentil 50 (p50) y percentil 75 (p75) entre la población sana y con episodios infecciosos. Cuando se comparan los valores obtenidos de la IgA1, las mujeres con episodios infecciosos presentaron niveles mayores de este subtipo en el calostro. Al comparar los niveles de la IgA2 estos se encontraron disminuidos en las mujeres que refirieron al menos una infección durante el embarazo. En los casos de la IgM y de la IgG estos no mostraron cambio entre ambas poblaciones.

Distribución de [Ig] de calostro en la población de estudio

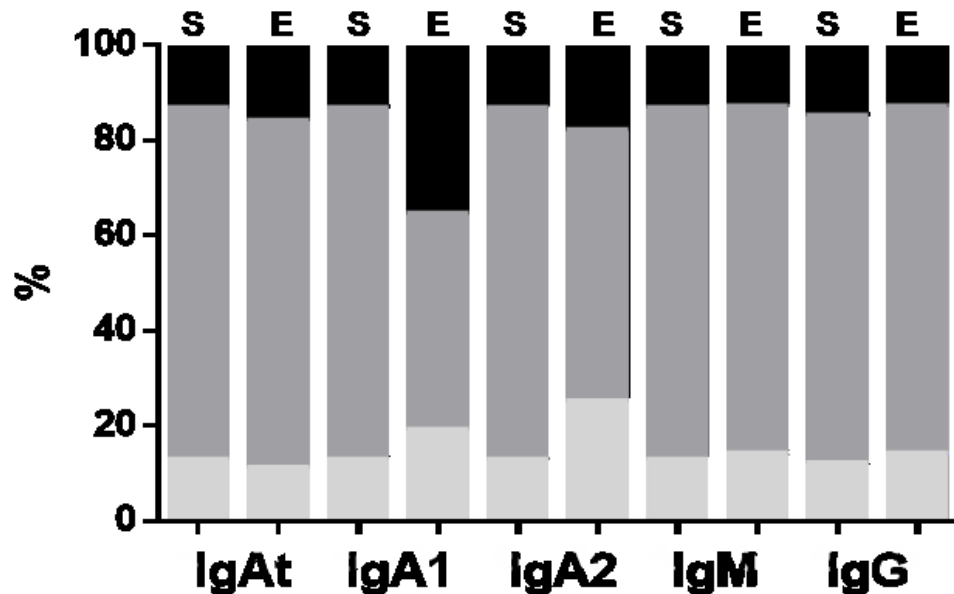


Figura 15. Distribución de Ig en calostro en la población de estudio estratificadas en mujeres sanas y mujeres con al menos un episodio infeccioso. Se muestran en percentiles de 25 o p25 % (gris claro), percentil 50 o p50 % (gris) y percentil 75 o p75 % (negro) de IgA total (IgAt), IgA1, IgA2, IgM e IgG en pacientes que no padecieron ninguna enfermedad en el embarazo o sanas (S) y que refirieron al menos un episodio infeccioso durante el embarazo (E) asociados a un solo compartimento mucosal.

6.8 La mayor incidencia de episodios infecciosos en el tracto respiratorio y en piel durante el embarazo aumenta los niveles de IgA1 en calostro

Los niveles de la IgA total no se modifican entre las mujeres sanas y con episodios infecciosos, sin embargo, al analizar por separado, los subtipos de IgA mostraron que la IgA1 aumentaba y la IgA2 disminuía en pacientes con al menos una enfermedad infecciosa asociadas a algún tipo de tracto mucosal. Al evaluar si esta variación en los niveles tenía alguna relación con el tipo de compartimento mucosal (Brandtzaeg; 2013) (Pakkanen; 2010) se llevó a cabo la evaluación en los cuatro principales compartimentos mucosales: tracto respiratorio alto o tejido linfoide asociado a nasofaringe, tracto gastrointestinal o tejido linfoide asociado a intestino, sistema tegumentario o tejido linfoide

asociado a piel y el tracto urogenital o tejido linfoide asociado a la cavidad urogenital. Como se muestra en la Figura 16A las pacientes que tuvieron más incidencia de episodios en infecciones asociadas al tracto respiratorio presentaron mayores niveles de IgA1 mientras que los niveles de IgA2 presentaron una tendencia a la baja. Mismo caso se encontró en la piel (Fig. 16B).

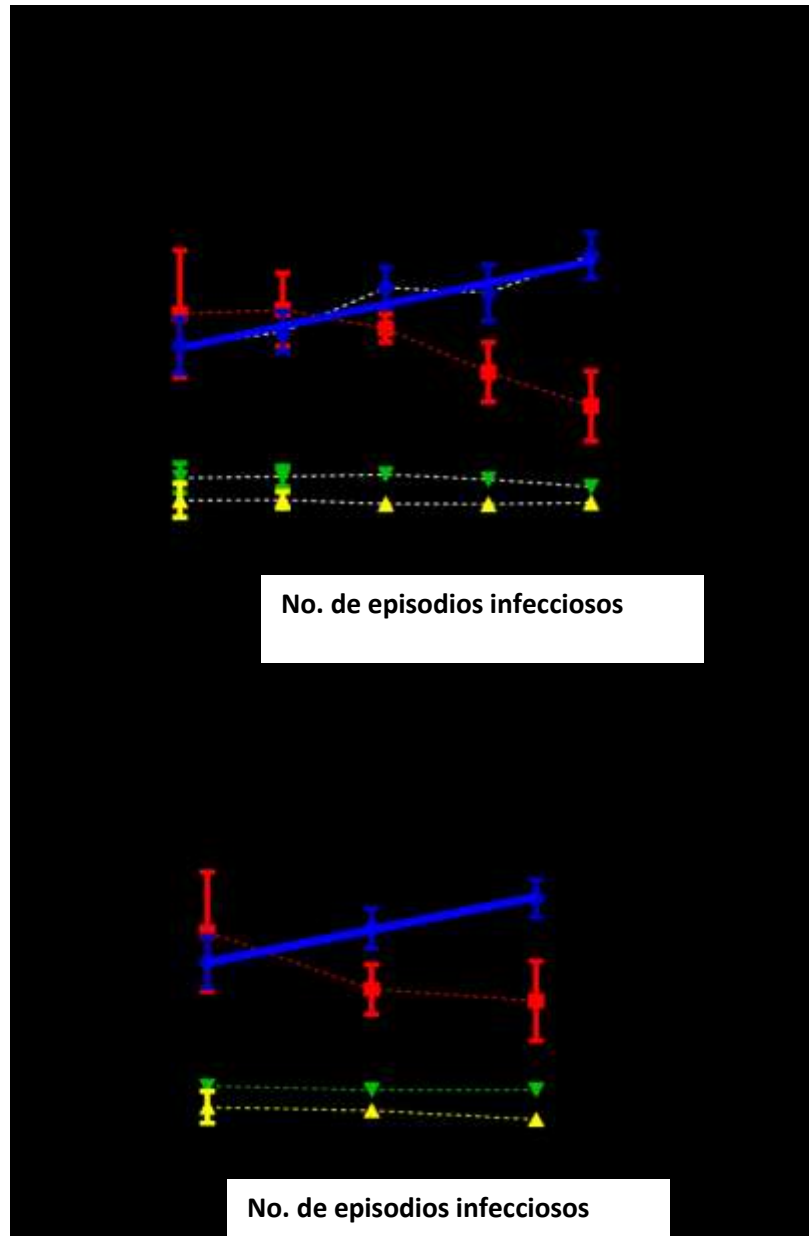


Figura 16. Los niveles de IgA1 en calostro se aumentan en mujeres con mayor incidencia de episodios infecciosos asociadas al tracto respiratorio y la piel. En el grafico 16A se muestran los valores de la cantidad de inmunoglobulinas IgA1 (azul),

IgA2 (rojo) IgM (amarillo) e IgG (verde) de calostro de mujeres que no presentaron infecciones (cero) o que tuvieron al menos una infección (1, 2, 3, 4 No. de episodios infecciosos, respectivamente) asociadas con el tracto respiratorio. En línea continua se conectan los conjuntos de datos que tuvieron correlación estadísticamente significativa. En líneas punteadas se unen los valores que tuvieron tendencia, pero sin significancia. En el gráfico 16B se muestran los valores de la cantidad de inmunoglobulinas entre mujeres sanas y con episodios asociados con piel. En línea continua se conectan los conjuntos de datos que tuvieron correlación estadísticamente significativa, así como el valor de la recta obtenida. En líneas punteadas se unen los valores que tuvieron tendencia, pero sin significancia estadística. Los resultados se muestran como la media \pm DE de al menos tres repeticiones. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de correlación de *Pearson* se consideró $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (***)).

6.9 La mayor incidencia de episodios infecciosos en el tracto gastrointestinal durante el embarazo aumenta los niveles de IgA2 en calostro

En la Figura 17A y B se muestran las asociaciones encontradas entre concentración de inmunoglobulinas en calostro y el número de infecciones asociadas a tracto gastrointestinal Fig. 17A o tracto urogenital Fig. 17B. Contrario a lo observado en el tracto respiratorio y en la piel. Los niveles de IgA2 aumentan al incrementar el número de infecciones asociadas a intestino, mientras que la IgA1 muestra un comportamiento inverso. Sin embargo, en el caso de episodios infecciosos asociados al tracto urogenital no se observan diferencias significativas, a pesar de que ambos subtipos de inmunoglobulinas muestran comportamientos asintóticos estos no fueron estadísticamente significativos.

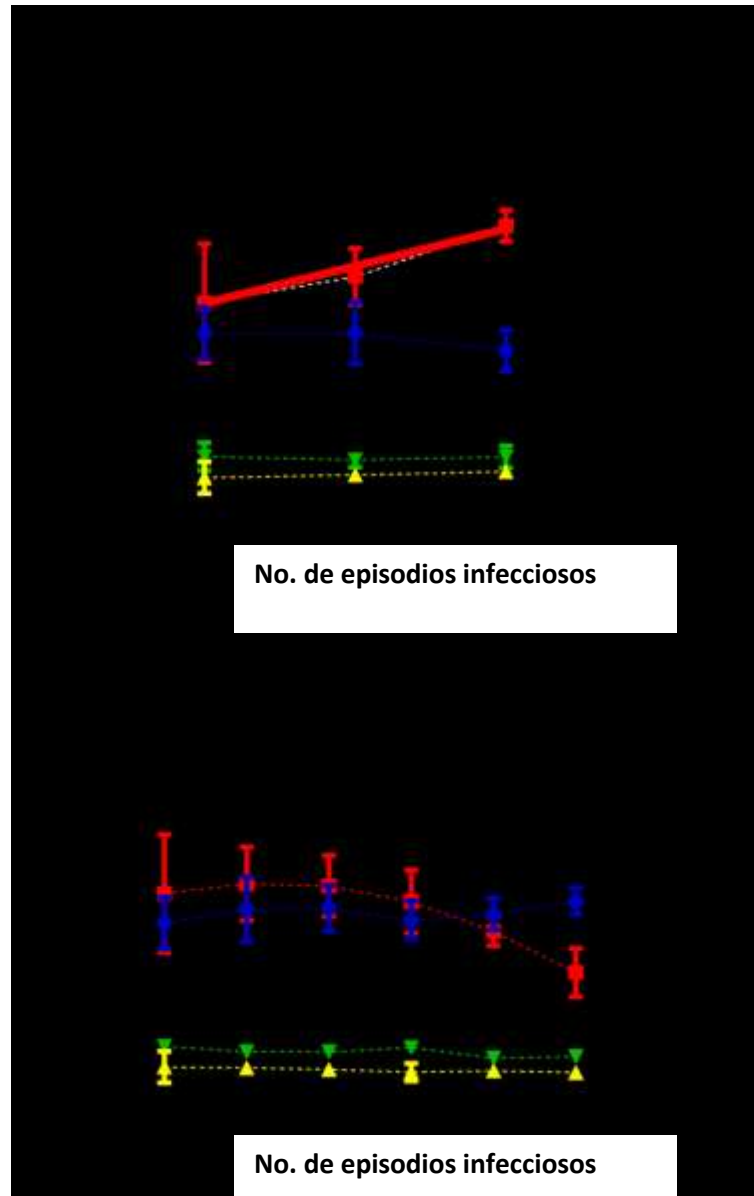


Figura 17. Los niveles de IgA1 en calostro se aumentan en mujeres con mayor incidencia de infecciones asociadas al tracto gastrointestinal. En el grafico 17A se muestran los valores de la cantidad de inmunoglobulinas IgA1 (azul), IgA2 (rojo) IgM (amarillo) e IgG (verde) de calostro de mujeres que no presentaron infecciones (cero) o que tuvieron al menos una infección (1, 2, 3, 4 No. de episodios infecciosos) asociadas con el tracto gastrointestinal. En línea continua se conectan los conjuntos de datos que tuvieron correlación estadísticamente significativa. En líneas punteadas se unen los valores que tuvieron tendencia, pero sin significancia estadísticamente significativa. En el grafico 17B se muestran los valores de la cantidad de inmunoglobulinas entre mujeres sanas y con episodios infecciosos asociados con tracto urogenital. En línea continua se conectan los conjuntos de datos que tuvieron correlación estadísticamente significativa, así como los valores de la recta obtenida. En líneas punteadas se unen los valores que tuvieron tendencia, pero sin significancia. Los resultados son mostrados como la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El análisis

estadístico se realizó utilizando la prueba de correlación de *Pearson* se consideró $p < 0.001$ (***)).

7. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados, el 97 % del total de la población de estudio es originaria de la Zona Metropolitana del Valle de México. La cual se conforma por las 16 Delegaciones de la Ciudad, 59 municipios que corresponden al Estado de México y uno al estado de Hidalgo (<http://sc.inegi.gob.mx/niveles/index.jsp>). Esto se debe a que, la selección de las pacientes se llevó a cabo en hospitales que son centros de salud de referencia especializada (HR 1º de octubre, HRAEI y HM), acuerdo al diario oficial de la federación (NORMA Oficial Mexicana NOM-024-SSA3-2010), y dan servicio a esta zona del país.

El INEGI y la Asociación Mexicana de Inteligencia de Mercado y Opinión (AMAI), clasifican a la población mexicana, de acuerdo con el ingreso económico mensual que perciben, en 6 niveles socioeconómicos (A/B= clase rica, C+= media alta, C= clase media, D+= clase media baja, D= clase pobre y E= pobreza extrema). Esta clasificación se basa en los ingresos que un hogar recibe en un mes, tomando en cuenta el número de habitantes y considerando las necesidades básicas de cada persona (vestido, techo, alimento, transporte, descanso, entretenimiento, etc.) (<http://www.inegi.org.mx>).

La mayoría de las mujeres que participaron en este estudio son de la clase media baja D+ (78,8 %) y la clase media C (13,2 %). Lo cual coincide con la población clínica entre los tres hospitales: Mientras que en el H R 1ro de octubre, la mayoría pertenece a los niveles socioeconómicos C+ y C (servidores públicos, instituciones educativas superiores, militares, administrativos, etc.); en el Hospital de la Mujer y en el HRAEI la población pertenece a los niveles socioeconómicos más bajos (C, D+, D y E) (NORMA Oficial Mexicana NOM-024-SSA3-2010).

En la población de estudio se encontró una alta incidencia de mujeres que tuvieron a su hijo por cesárea. Esto se explica porque, aunque en la práctica médica diaria, el parto fisiológico es de primera elección por sobre el quirúrgico. Cuestiones clínicas como la edad de la madre, la desproporción céfalo pélvica (Mitteroecker P et al; 2016), las complicaciones del embarazo como la hipertensión, riesgo de preclampsia, etc., hacen necesario el parto quirúrgico (Peate et al; 2017) (Engler et al; 2017).

La frecuencia de edades en la población fue mayor para rangos de entre 14 a 20 años y de entre 35 a 43 años (dato no mostrado). Al ser madres jóvenes, su cadera no se encuentra totalmente desarrollada, aumentando el riesgo de una desproporción céfalo pélvica (Mitteroecker et al; 2016). Mientras que, una edad mayor aumenta la probabilidad de padecer complicaciones durante el parto (Peate, et al; 2017) (Engler et al; 2017). Por lo cual fue necesario programar partos quirúrgicos para estas mujeres.

Cabe aclarar que todas las pacientes que participaron en el estudio y tuvieron a su hijo/a por medio del parto quirúrgico, no mostraron complicaciones de ningún tipo y cumplieron, al menos, las 38 semanas de embarazo para la fecha de su cirugía.

La concentración de proteínas en el calostro se encuentra entre los 35 a 45 mg/mL (Godhia & Patel; 2013) (Mangel et al; 2017), lo cual coincide con el resultado obtenido en este estudio (43,91 mg/mL). Ya que la cantidad de proteínas se ha tomado como valor de referencia para la cuantificación de moléculas específicas en el calostro (Godhia & Patel; 2013), se decidió realizar la misma estrategia metodológica:

Para garantizar que la gran mayoría de proteínas se encontraban en la fase acuosa, probando su ausencia en la fase lipídica y en el paquete celular (datos no mostrados). Y para tener un control de estabilidad al determinar los niveles de proteínas en las muestras después del periodo del almacenamiento a -70 °C, ya que se ha comprobado que puede haber evaporación, si las muestras no son

acondicionadas correctamente, como tubos mal cerrados; lo que conduce a fallos experimentales (Ramírez-Santana et al; 2012).

Los resultados mostraron que las condiciones de almacenamiento no afectaron la concentración de proteínas, lo que permitió comparar esta variable entre las 500 muestras. El valor obtenido de correlación r fue de 0,9682, que habla de un buen tratamiento de las muestras y de una buena estabilidad durante su congelamiento al menos, en los meses que duró el protocolo.

La distribución de IgA1 e IgA2 se encuentra bien definida en los diferentes compartimentos de las mucosas (Lin et al; 2014), con respecto a cada compartimento o región del sistema mucosal (Macpherson; 2008), mientras que en el calostro y la leche las proporciones son más variables (Mangel et al; 2017) y la producción de estas está muy regulado por el cuadro hormonal de la placenta, durante el embarazo (John; 2017) y por el estímulo de amamantamiento, durante la lactancia (Butner et al; 2017).

Los resultados mostraron que la IgA2 (12,83 mg/mL) es el subtipo más abundante en calostro, seguida por la IgA1 (10,00 mg/mL). Esto se explica por la estabilidad estructural de la IgA2 en secreciones en comparación con la IgA1 (Brandtzaeg & Johansen; 2005).

Ambos subtipos de IgA se encuentran muy elevados en comparación con los niveles de IgG y de IgM. Esto se explica por la mayor cantidad de las células secretoras de IgA2 e IgA1, que arriban a la glándula mamaria durante el embarazo (Gjorevski & Nelson; 2011) (Butner et al; 2017), en comparación con el número de las células secretoras de IgG e IgM. Lo anterior concuerda con los datos reportados por otros equipos de investigación (Trégoat et al; 2001).

La regulación hormonal propia del embarazo permite que, por efecto de la progesterona, se expresen CCL25 y CCL28; y mayores niveles de MadCAM-1 (Gruber; 2004) (Klinge; 2001) en endotelios de la glándula mamaria durante los últimos meses del embarazo. Y al final de esta etapa, los estrógenos inducen un aumento de VCAM-1 (Klinge; 2001) (Gruber; 2004) para que las células

secretoras de anticuerpos IgA1 ($\alpha 4\beta 1+$) e IgA2 ($\alpha 4\beta 7+$) y, en menor número, las células secretoras de IgG ($\alpha 4\beta 1^{\text{low}}$) e IgM (CCR9); para que estas poblaciones puedan arribar a la glándula y acumularse en el estroma cerca de los acinos mamarios durante el embarazo (Peate et al; 2017) y en la lactancia.

En este estudio, se observó que más del 90 % del total de la IgA, se encuentra como IgAS, la cual fue transportada por transcitosis; mientras que el restante 10 % fue transportada por otros mecanismos, en asociación a otros receptores o a través del transporte paracelular, ya que se sabe que durante el inicio de la lactancia las uniones estrechas en el epitelio del acino son más débiles (Brandtzaeg; 2010) y permiten el paso de complejos proteínicos de alto peso molecular a la luz del ducto mamario.

El total de la IgM se transportó a través del pIgR, lo cual indica que la transcitosis es el único mecanismo de transporte para este isotipo en la glándula mamaria. En modelos de ratón se sabe que al silenciar la expresión de pIgR, la IgA disminuye de forma significativa en secreciones y la IgM ya no es detectada (Sörensen et al; 2000) (Brandtzaeg; 2010) lo cual apoyaría lo observado en este trabajo. Mientras que el caso de la IgG, su transporte es independiente del pIgR y éste se deba a otros mecanismos los cuales, hasta el momento, se desconocen en el humano (Cianga et al; 1999).

Una de las desventajas más importantes al realizar estudios clínicos en población humana abierta es que se deben de considerar variables de estratificación en el estudio (Ziliak; 2017). Para el presente estudio se consideró si la edad de las madres, el número de parto o el tipo de parto afectaban los niveles de inmunoglobulina presentes en el calostro.

La distribución del número de parto (primer parto, segundo, tercero, etc.) fue bastante homogénea (datos no mostrados), con un número ligeramente mayor de madres que son primerizas. Probablemente por los programas de concientización y de planificación familiar, que se han estado llevando durante los últimos años en esta región del país (Programa de Acción específico PAE

planificación familiar y anticoncepción 2013-2018), aunque se requerirían más estudios al respecto.

En cuanto al número de partos en función a los niveles de las inmunoglobulinas, no hay cambios claros en la cantidad de Ig en calostro entre mujeres uníparas o multíparas. Lo cual coincide con estudios anteriores (Ballard & Morrow; 2014), sin embargo, las comparaciones deberían hacerse individualmente y ser evaluadas con respecto al tiempo (Ballard & Morrow; 2014) y no entre diferentes personas.

Dependiendo del subtipo, los niveles de IgA mostraron tendencias en función a la edad de las mujeres y por el tipo de parto. Este tipo de comportamiento ya se había descrito en trabajos anteriores (Hurley; 2011) (Mitteroecker et al; 2016). Esto coincide con los datos reportados en este estudio, sobre todo para el subtipo IgA2.

Estas diferencias se deben a la regulación hormonal en función de la edad (disminución de estrógenos y progesterona con el aumento de los niveles de hormonas androgénicas); y durante el parto, por el incremento súbito de la oxitocina en el parto fisiológico, mayor nivel de progesterona y estrógenos y un aumento en la cantidad de las células secretoras de IgA en la glándula mamaria (Low et al; 2010). Este aumento tendría un efecto discreto en los niveles encontrados en calostro, sin alcanzar una diferencia significativa.

Existen dos tipos de IgA, de acuerdo con la composición bioquímica del antígeno que reconocen: el primero se le conoce como IgA polirreactiva o natural, esta se produce por linfocitos B activados en respuesta a antígenos T independientes (Macpherson et al; 2016); que responden principalmente a microorganismos propios de la microbiota normal o comensales (Okai et al; 2016). Estos linfocitos también pueden migrar a otros tejidos del sistema

inmunológico (Kunkel & Butcher; 2003), como la glándula mamaria (Lin et al; 2014).

Probablemente este sea el origen de la IgA (IgA1 e IgA2) en las mujeres que no presentaron infecciones en el embarazo o sin sintomatología que pudieran referir y es la IgA que, de forma homeostática, la madre provee a su hijo cuando no se presenta algún episodio infeccioso durante el embarazo.

Al segundo tipo se le conoce como IgA específica, que es el producto de la respuesta a antígenos primordialmente de naturaleza proteica o T dependientes. Esta IgA es generalmente de alta afinidad y se considera de producción local por células plasmáticas residentes de lámina propia de las mucosas, principalmente de los sitios efectores (Kugelber; 2016) en respuesta a una infección. Este tipo de IgA es el que probablemente se detectó en las variaciones de madres que tuvieron episodios infecciosos en general.

Las células secretoras de IgA pueden residir por largos periodos de tiempo en nichos de supervivencia especializados (Kunkel & Butcher; 2003) (Seong; 2017) permitiendo su acumulación en la glándula mamaria. Lo cual explicaría que, un mayor número de episodios infecciosos durante el embarazo aumentara las cantidades de Ig en el calostro, por el efecto de acumulación por cada episodio infeccioso.

Ya que, de acuerdo con la hipótesis de la higiene (Isolauri; 2017), una madre que tenga un mayor número de contactos con diversos antígenos durante el embarazo producirá una cantidad relativamente más alta de anticuerpos en calostro y leche para la defensa, la protección y el desarrollo del neonato (Brandtzaeg; 2010) (Godhia & Patel; 2013).

En respuesta a una infección, la producción y migración (Druzd et al; 2017) de los precursores de las células plasmáticas IgA1+ ($\alpha 4\beta 1+$) o IgA2+ ($\alpha 4\beta 7+$) dependen del sitio inductor en el Sistema Inmunológico Mucosal (Kunkel & Butcher; 2003) (Seong et al; 2017) (Erkelens & Mebius; 2017) (Belkaid & Harrison; 2017). La forma de inducción entre cada compartimento es diferente y presenta características distintivas entre una y otra por lo cual se obtienen

diferencias entre los subtipos de IgA que se detectaron en cada tipo de infección (Lemke et al; 2016) (Yekyung et al; 2017).

El tracto respiratorio y la piel se consideran sitios donde se facilita la producción de IgA1 por sobre la IgA2 (Meglio et al; 2011) (Khairutdinov et al; 2017) (Belkaid & Harrison; 2017), esto debido al aumento en la expresión de VCAM-1 en la mucosa y en piel, que permite el arribo de células $\alpha 4\beta 1+$. En las vías respiratorias altas esto se debe a una mayor diferenciación a células secretoras de IgA1, probablemente por la expresión en bajos niveles de APRIL (He et al; 2007). En la dermis, cerca de los primeros extractos de la epidermis y alrededor de los folículos pilosos, las poblaciones celulares $\alpha 4\beta 1+$ pueden llegar y residir en la piel, las cuales se generaron a partir de respuestas locales y de los sitios inductores como el tracto respiratorio alto (Nestle et al; 2009).

En el intestino delgado, el subtipo en mayor proporción es la IgA1, sin embargo, durante infecciones se sabe que la proporción puede variar y aumenta de manera muy importante los niveles de IgA2 (Tropini et al; 2017) (Marchant et al; 2017) (Agace & Mc Coy; 2017) por medio de la señalización inducida por APRIL (He et al; 2007).

En el intestino grueso las células residentes expresan mayores niveles de CCL25 y APRIL en comparación con el intestino delgado (Bourges et al; 2008) (Shyer et al; 2015), los cuales facilitan de manera importante la diferenciación de células productoras de anticuerpo IgM+ o IgA1+ a IgA2+ (Fagarasan & Honjo; 2003) (Chu et al; 2017).

En el tracto genitourinario se observó un ligero aumento de la IgA1 y una disminución para la IgA2 en mujeres con episodios infecciosos sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Esto se debe a que, esta mucosa se considera como sitio efector de la respuesta inmunológica (Brandtzaeg & Johansen; 2005), sin recirculación importante de células secretoras de anticuerpos a la glándula mamaria durante una infección (Low et al; 2010).

Un efecto observado durante la evaluación de los niveles de IgA1 e IgA2, es que, mientras un isotipo aumenta en función al número de episodios infecciosos

en un tracto mucosal; el otro subtipo disminuye. Esto está relacionado con que, durante el embarazo, el endotelio de la glándula mamaria expresa de forma constitutiva cantidades basales de VCAM-1 y MadCAM-1, independientemente de la presencia de episodios infecciosos (Marchant et al; 2017). El arribo de células secretoras de un subtipo específico de IgA se favorece sólo por el aumento en el número de células producto del proceso de infección en un compartimento específico. Sin embargo, se requieren más estudios.

Estos resultados proveen evidencia para entender el efecto de las inmunizaciones e infecciones durante el embarazo que una mujer clínicamente sana puede presentar de manera normal, da una idea de los posibles efectos que tendría en la protección del recién nacido. Este trabajo fue la primera evidencia experimental en la cual se describió el efecto que tuvieron episodios de infecciones en mujeres durante el embarazo en los niveles de IgA1 e IgA2 en el calostro.

8. CONCLUSIONES

8.1 Cuantificación de Ig e Ig-SC en calostro

1. La IgA2 es el subtipo presente en mayor cantidad en el calostro. El 90,74 % del total de la IgA y prácticamente toda la IgM (99,09 %) se transportan por transcitosis.
2. Los niveles de IgA1 e IgA2 en calostro no varían entre tipos de parto, edad de las madres ni entre mujeres multíparas y uníparas.

8.2 Correlación entre la [Ig] y el número de episodios infecciosos

1. Un mayor número de episodios de enfermedades infecciosas del tracto respiratorio o de la piel, durante el embarazo, incrementa los niveles de IgA1 en calostro.
2. Un mayor número de episodios de enfermedades infecciosas del tracto gastrointestinal, durante el embarazo, incrementa los niveles de IgA2 en calostro.

9. PERSPECTIVAS

1. Determinar la relación del número de episodios infecciosos en las madres durante el embarazo con el número de episodios infecciosos en el producto durante los primeros meses de vida
1. Cuantificar los niveles de inmunoglobulinas específicas de antígeno en el calostro de las madres y en saliva del hijo durante los primeros meses de vida

10.REFERENCIAS

- Agace W, McCoy K (2017) Regionalized development and maintenance of the intestinal Adaptive immune landscape. *Cell press*. 46(4):532-548
- Aliberti J (2016) Immunity and tolerance induced by intestinal mucosal dendritic cells. *Mediators of inflammation*. ID3104727
- Bahrami A, Hasanzadeh M, ShahidSales S, Yousefi Z, Kadkhodayan S, Farazestanian M, Mashhad M, Gharib M, Hassanian S, Avan A (2017) Clinical significance and prognosis value of Wnt signaling pathway in cervical cancer. *Journal of cellular biochemistry*.86/187.
- Ballabio C, Bertino E, Coscia A, Fabris C, Fuggetta D, Molino S, Testa T, Sgarrella M, Sabatino G, Restani P (2007) Immunoglobulin-A profile in breast milk from mothers delivering full term and preterm infants. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 20(1):119-128.
- Ballard O, Morrow A (2014) Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 60(1):49-74.
- Belkaid Y, Harrison O (2017) Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity Cell Press*. 46(4)562-576
- Biesbroek G, Tsivitsivadze E, Sanders E, Montijn R, Veenhoven R, Keijser F, Bogaert D (2014) Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *AJRCCM*. 190(11): doi.org/10.1164
- Bourges D, Meurens F, Berri M, Salmon H, Zanello G, Levast B, Melo S, Gerds V (2008) New insights into the dual recruitment of IgA(+) B cells in the developing mammary gland. *Molecular Immunology* 45(12):3354-62.
- Brandtzaeg P (2003) Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*. 21: 3382–88.
- Brandtzaeg P (2010) The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr*. 156(2 Suppl):S8-S15
- Brandtzaeg P (2013) Secretory IgA: designed for anti-microbial defense. *Frontiers in immunology*. 4(222):1-17.
- Brandtzaeg P, Johansen F (2005) Mucosal B cells: phenotypic characteristics,

transcriptional regulation, and residency properties. *Immunological Reviews*. 20:32-63.

Briana D, Boutsikou M, Boutsikou T, Marmarinos A, Gourgiotis D, Malamitsi-Puchner A (2017) Novel bioactive substances in human colostrum: could they play a role in postnatal adaptation?. *The journal of maternal fetal & neonatal medicine*. 30(5): doi.org/10.1080/14767058.2016.1177817

Brisken C, O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in biology*.w(12):a003178.

Butner J, Cristini V, Wang Z (2017) Modeling mammary gland development: understanding the role of cell types and hormonal signaling in the terminal end bud. *Atlas of science*.

Cacho N, Lawrence R (2017) Innate immunity and breast milk. *Front Immunol*. doi.org/10.3389.

Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Pérez-Cano F, Moretones M, López-Sabater M, Franch A. (2011) Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr*; 141: 1181–1187.

Castro C, Flajnik M (2014) Putting J-chain back on the how might its expression define plasma cell development? *J Immunol*. 193(7): 3248–3255

Chintalacheruvu K, Bholra N, Kobayashi K, Fernandez C, Morrison S (2002) Cysteine residues for the attachment of the light chain in human IgA2. *J Immunol* 1;169(9):5072-5077

Chintalacheruvu K, Chuang P, Dragoman A, Fernandez C, Qiu J, Plaut A, Trinh K, Gala F, Morrison S (2003) Cleavage of the Human Immunoglobulin A1 (IgA1) Hinge Region by IgA1 Proteases Requires Structures in the Fc region of IgA. *Infect Immunol*. 71(5):2563-2570.

Chu D, Ma J, Prince A, Antony K, Seferovic M, Aagaard K (2017) Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature Medicine*. 23: 314-326

Cianga P, Medesan C, Richardson J, Ghetie V, Ward E (1999) Identification and

- function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. *Eur J Immunol* 29(8):2515-2523.
- Costello E, Lauber C, Hamady M, Fierer N, Gordon J, Knight R (2009) Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 326(5960):1694-1697.
- Demirjian A, Levy O (2009) Safety and efficacy of neonatal vaccination. *Eur J Immunol*. 39(1):36-46.
- Druzd D, Matveeva O, Ince L, Harrison U, He W, Schmal C, Herzel H, Tsang A, Kawakami N, Leliavski A, Uhl O, Yao L, Sander L, Chen C, Kraus K, de Juan A, Hergenhan S, Ehlers M, Koletzko B, Haas R, Solbach W, Oster H, Scheiermann C (2017) Lymphocyte circadian clocks controls lymph node trafficking and adaptive immune responses. *Cell press immunity*. 120(46):.120-132
- Engler J, Kursawe N, Solano M, Patas K, Wehrmann S, Heckmann N, Lühder F, Reichardt H, Arck P, Gold S, Friese M (2017) Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy. *Jan Border Engler* 114(2):E181-E190.
- Erkelens M, Mebius R (2017) Retinoic acid and immune homeostasis: a balancing act. *Trends in immunology*. 1353
- Fagarasan S, Honjo T (2016) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol*. 3(1): 63-72.
- Friedrich M (2016) Sluggish progress in improving breastfeeding practices. *Jamanetwork*. 316(15):1537
- Fujimura K, Sitarik A, Havstad S, Lin D, Levan S, Fadrosch D, Panzer A, LaMere B, Rackatityte E, Lukacs N, Wegienka G, Boushey H, Ownby D, Zoratti E, Levin A, Johnson C, Lynch S (2016) Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nature Medicine*. 22:1187-1191
- Gjorevski N, Nelson C (2011) Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12(9):doi:10-1038.
- Godhia M, Patel N (2013) Colostrum – Its composition, benefits as a nutraceutical: a review. *Current research in nutrition and food science*. 1(1):37-47.

- Gruber C, Gruber D, Gruber I, Weiser F, Huber J (2004) Anatomy of the estrogen response element. *Trends endocrinol metab* 15(2):73-78
- Guzman-Bautista E, Garcia-Ruiz C, Gama-Espinosa A, Ramirez-Estudillo C, Rojas-Gomez O, Vega-López, M (2013) Effect of age and maternal antibodies on the systemic and mucosal immune response after neonatal immunization in a porcine model. *Immunology*. 141: 609-616 60.}
- Guzman-Bautista E, Ramirez-Estudillo C, Rojas-Gomez O, Vega-López, M (2015) Tracheal and bronchial polymeric immunoglobulin secretory immune system (PISIS) development in a porcine model. *Dev Comp Immunol*. 53(2):271-282.
- Hargreaves D, Hyman P, Lu T, Ngo V, Afshin B, Zou Y, Littman D, Cyster J (2001) A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194(1):45-56
- Hartmann P, Owens R, Cox D, Kent J (1996) Breast development and control of milk synthesis. *Food and nutrition bulletin*. 17(4):292-302.
- He B, Xu W, Santini P, Polodorides A, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles D, Rescigno M, Cerutti A (2007) Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A (2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 26(6):812-826
- Hennighausen L, Robinson G (2005) Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6 9: 715-725.
- Hernández-Ruiz M, Zlotnik A (2017) Mucosal chemokines. *Journal Interferon Cytokine* 32(2); 62-70
- Ho F, Wong R, Lawton J (1979) Human colostrum and breast milk cells. A light and electron microscopic study. *Acta Paediatrica*. 68(4):389-396.
- Hoffman W, Lakkis F, Chalasani G (2016) B cells, Antibodies, and More. *Clon J AM Soc Nephrol*. 11(1):137-154
- Huang J, Guerrero A, Parker E, Strum JS, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB.(2015) Site-specific glycosylation of secretory immunoglobulin A from human colostrum. *J Proteome Res*. 14(3):1335-49

- Hurley W (2011) Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*. 3(4):442-474.
- Isolauri E (2017) Microbiota and obesity. *Intestinal Microbiome: Functional Aspects in Health and Disease*. doi:455217.
- Joakim J, Bergström E, Hui X, Birgitta H (2017) Epitope-Specific Suppression of IgG Responses by Passively Administered Specific IgG: Evidence of Epitope Masking. *Front Immunol*. 2017; 8: 238.
- Johansen F, Braathen R, Brandtzaeg P (2000) Role of J chain in Secretory Immunoglobulin Formation. *Scand. Journal Immunology* 52:240-248
- Johansen F, Braathen R, Brandtzaeg P (2001) The J chain is essential for polymeric Ig receptor mediated epithelial transport of IgA. *Journal Immunology* 167:5185-5192
- Johansen F, Brandtzaeg P (2004) Transcriptional regulation of the mucosal IgA system. *Trends Immunology* 25(3):150-157
- Johansen F, Kaetzel C (2011) Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal immunology*. 4(6):598-602
- John R (2017) Imprinted genes and the regulation of placental endocrine function: pregnancy and beyond. *Placenta*.
- Kaetzel C (2005) The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol rev* 206:83-99.
- Khairutdinov V, Mikhailichenko A, Belousova I, Kuligina E, Smatsov A, Imyanitov E (2017) The role of intradermal proliferation of T-cells in the pathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol*. 92(1):41-44
- Kirylyuk K, Novak J (2014) The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *124* 6:2325-2632.
- Kitaura K, Yamashita H, Ayabe H, Shini t, Matsutani T, Suzuki R (2017) Different somatic hypermutation levels among antibody subclasses disclosed by a new next generation sequencing-based antibody repertoire analysis. *Front Immunol*. 8(839):10.3389

- Klinge C (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids res.* 15;29(14):2905-2919
- Koledova Z, Lu P (2017) A 3D fibroblast-epithelium co-culture model for understanding microenvironment role in branching morphogenesis of mammary gland. *Mammary gland development.* 1501:217-231.
- Kollman T, Kampmann B, Mazmanian S, Marchant A, Levy O (2017) Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity Cell Press* 21;46(3):350-363.
- Kugelber E (2016) Searching for the antibody producers. *Nature Milestones Antibodies.* S7
- Kunkel E, Butcher E (2003) Plasma cell-Homing. *Nature Reviews* 3:822-829
- Kutteh W, Mestecky J (1994) Secretory immunity in the female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol.* 31(1):40-46
- Kverva M, Burianova J, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Cinova J, Tuckova L, Tlaskalova-Hogenova H (2007) Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clinical Chemistry.* 53(5):955-962.
- Lemke A, Kraft M, Roth K, Riedel R, Lammerding D, Hauser A (2016) Long-lived plasma cells are generated in mucosal immune responses and contribute to the bone marrow plasma cell pool in mice. *Mucosal Immunol* 9(1):83-97
- Lin M, Du L, Brandtzaeg P, Pan-Hammarström Q (2014) IgA subclass switch recombination in human mucosal and systemic immune compartments. *Mucosal immunology.* 7;511-520.
- Low E, Zagieboylo L, Martino B, Wilson E (2010) IgA ASC accumulation to the lactating mammary gland is dependent on VCAM-1 and alpha4 integrins. *Mol. Immunol.* 47(7-8):1608-1612.
- Macpherson A (2008) The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 1(1):11-22
- Macpherson A, Köller Y, McCoy K (2016) The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA. *Trends in immunology.* 36(8):460-470

- Mangel L, Mimouni F, Feinstein-Goren N, Lubetzky R, Mandel D, Marom R (2017) The effect of maternal habitus on macronutrient content of human milk colostrum. *J Perinatol.* doi: 10.1038.
- Mantis N, Rol N, Corthésy B (2011) Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 4(6):603-611.
- Marchant A, Sadarangani M, Garand M, Dauby N, Verhasselt V, Pereira L, Bjornson G, Jones C, Halperin S, Edwards K, Heath P, Openshaw P, Scheifele D, Kollman T (2017) Maternal immunisation: collaborating with mother nature. *The lancet Infectious diseases.* 3099(17):30229-3
- McBryan J, Howlin J (2017) Pubertal mammary gland development: elucidation of in vivo morphogenesis using murine models. *Mammary gland development.* 1501: 77-114.
- McGovern N, Shin A, Low G, Duan K, Yao J, Msallam R, Low I, Shadan N, Sumatoh H, Soon E, Lum J, Mk E, Hubert S, See P, Kunxiang E, Lee Y, Janela B, Choolani M, Mattar C, Fan Y, Lim T, Hong D, Tan K, Tam J, Schuster C, Elbe-Bürger A, Wang X, Bigley V, Collin M, Hanniffa M, Schlitzer A, Poidinger M, Albani S, Larbi A, Newell E, Chan J, Ginhoux F (2017) Human fetal dendritic cells promote prenatal T-cell immune suppression through arginase-2. *Nature Letters.* Doi:10.1038/nature22795.
- Meglio D, Perera G, Nestle F (2011) The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity Cell press.* 35(6)857-869
- Mei H, Yoshida T, Wime W, Hiepe F, Thiele K, Manz R, Radbruch A, Dörner T (2009) Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* 113(11)2461-2469.
- Michaelsen T, Emilsen S, Sandin R, Granerud B, Bratlie D, Ihle O, Sandle I (2017) Human secretory IgM antibodies activate human complement and offer protection at mucosal surface. *Experimental immunology.* 85(1):43-50
- Mitteroecke P, Huttegger S, Fischer B, Pvlincev M (2016) Cliff-edge model of obstetric selection in humans. *PNAS.* Doi/10.1073/pnas.1612410113
- Mkaddem S, Christou I, Rossato E, Berthelot L, Lehuen A, Monteiro R (2014) IgA, IgA

receptors, and their anti-inflammatory properties. *Curr Top Microbiol Immunol*. 382:221-235.

Mora J, von Adrian U (2008) Differentiation and homing of IgA secreting cells. *Nature publishing group*. Doi:10.1038/mi2007.14

Munblit D, Treneva M, Peroni D, Colicino S, Chow L, Dissanayeke S, Abrol P, Sheth S, Pampura A, Boner A, Geddes D, Boyle R, Warner J (2016) Colostrum and mature milk of women from London, Moscow, and Verona: Determinants of immune composition. *Nutrients*. 695; doi:10.3390/nu8110695.

Nestle F, Di Meglio P, Qin J, Nickoloff B (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 9(10):679-691

Niewiesk S (2014) Maternal antibodies: Clinical Significance, Mechanism of Interference with Immune Responses, and Possible Vaccination Strategies. *Front Immunol*. 2014; 5: 446. Published online 2014 Sep 16. doi: 10.3389/fimmu.2014.00446

NORMA Oficial Mexicana NOM-024-SSA3-2010, Que establece los objetivos funcionales y funcionalidades que deberán observar los productos de Sistemas de Expediente Clínico Electrónico para garantizar la interoperabilidad, procesamiento, interpretación, confidencialidad, seguridad y uso de estándares y catálogos de la información de los registros electrónicos en salud. *Diario Oficial de la Federación*.

NORMA Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano. *Diario Oficial de la Federación*.

Ogra SS, Weintraub D, Ogra PL (1977) Immunologic aspects of human colostrum and milk. III. Fate and absorption of cellular and soluble components in the gastrointestinal tract of the newborn. *J Immunol*. 119: 245–48.

Oh J, Byrd A, Park M, Kong H, Segre J (2016) Temporal stability of the human skin microbiome. *Cell press*. 165(4):854-866.

Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R (2016) High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice.

- Nature microbiology. 1(9):16103. Doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.103.
- Pabst O, Cerovic V, Hornef M (2016) Secretory IgA in the coordination of establishment and maintenance of the microbiota. *Cell Press Trends immunol.* 37 5: 287-296
- Pakkanen S, Kantele J, Moldoveanu Z, Hedges S, Häkkinen M, Mestecky J Kantele A (2010) Expression of homing receptors on IgA1 and IgA2 plasmablasts in blood reflects differential distribution of IgA1 and IgA2 in various body fluids. *Clin Vaccine Immunol.* 17(3):393-401.
- Peate M, Lesley S, Martha H (2017) Fertility after breast cancer and strategies to help women achieve pregnancy. 41(1)32-39.
- Ramírez-Santana C, Pérez Cano F, Audí C, Castell M, Moretones M, López-Sabater M, Castellote C, Franch A (2012) Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. *J Dairy Sci,* 95(5):doi10.3168/jds.2011-5066.
- Rasmussen S, Martin L, Ostergaard M, Rudloff S, Roggenbuck M, Ninh Nguyen D, Sangild P, Bering S (2017) Human milk oligosaccharide effects on intestinal function and inflammation after preterm birth in pigs. *The Journal of nutritional biochemistry.* 40:141-154.
- Ratajczak C, Guisset A, Detry B, Sibille Y, Pilette C (2010) Dual effect of neutrophils on pIgR/SC in human bronchial epithelial cells. *J biomed biotechnol* 2010(ID:428618)
- Ratsimandresy R, Mohanalaxmi I, Dorfleutner A, Stehlik C (2017) The AIM2 inflammasome is a central regulator of intestinal homeostasis through the IL-18/IL-22/STAT3 pathway. *Cellular & molecular immunology.* 14: 127-142
- Reboldi A, Cyster J (2016) Peyer's patches organizing B-cell responses at the intestinal frontier. 271 1: 230-245.
- Rott L, Briskin M, Eugene B (2000) Expression of $\alpha 4\beta 7$ and E-selectin ligand by circulating memory B cells: implications for targeted trafficking to mucosal and systemic sites. 68 6: 807-814.
- Roux M, Mc Williams M, Philips-Guagliata J, Weisz-Carrington P, Lamm M (1977) Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *The journal of experimental medicine.* 146:1311-1322.

- Schroeder H, Cavacini L (2013) Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125(202):S41-S52
- Sealy S, Surman Sk Hurwitz J (2017) CD4+ T cells support establishment of RSV-specific IgG and IgA antibody secreting cells in the upper and lower murine respiratory tract following RSV infection. *Vaccine*. 35 20:2617-2621.
- Senior B, Dunlop J, Batten M, Kilian M, Woof J (2000) Cleavage of a Recombinant Human Immunoglobulin A2 (IgA2)-IgA1 Hybrid Antibody by Certain Bacterial IgA1 Proteases. *Infect Immunol*. 68(2):463-469.
- Seong Y, Lazarus N, Sugherland L, Habtezion A, Abramson T, He X, Greenberg H, Butcher E (2017) Trafficking receptor signatures define blood plasmablasts responding to tissue-specific immune challenge. *JCI insight*. 2(6):e90233.
- Shyer A, Huycke T, Lee C, Mahadevan L, Tabin C (2015) Bending gradients: how the intestinal stem cells gets it home. *Cell press*. 161(3):569-580
- Siegrist C (2003) Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*. 2003 Jul 28;21(24):3406-12.
- Sinanoglou V, Cavouras D, Boutsikou T, Briana D, Lantzouraki D, Paliatsiou S, Volaki P, Bratakos S, Malamitsi-Puchner A, Zoumpoulakis P (2017) Factors affecting human colostrum fatty acid profile: A case of study. *PLoS ONE* 12(4): doi.org/10.1371/journal.pone.0175817
- Smith P (2017) Non-canonical WNT signaling through ROR2 and VANGL2 in mammary gland development. Santa Cruz California PhD thesis.
- Sörensen V, Rasmussen I, Sundvold V, Michaelsen T, Sandle I (2000) Structural requirements for incorporation of J chain into human IgM and IgA. *International Immunology* 12(1):19-27
- Spencer J, MacDonald T, Finn T, Isaacson P (1986) The development of gut associated lymphoid tissue in the terminal ileum of fetal human intestine. *Clin Exp Immunol*. 64(3):536-543.
- Strugnell R, Wijburg O (2010) The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol*. 8 9: 656-667.

- Stuebe A (2009) The risks of not breastfeeding for mothers and infants. *Rev Obstet Gynecol.* 2(4):222-231.
- Thiebaut C, Chammard-Jovenin C, Chesnel A, Morel C, Djermoune E, Boukhobza T, Dumond H (2017) Mammary epithelial cell phenotype disruption in vitro and in vivo through ERalpha36 overexpression. *Plos one.* 12(3):30273931.
- Trégoat V, Montagne P, Béné M, Faure G (2001) Increases of IgA concentrations correlate with IgA2 increment. *J Clin Lab Anal.* 15(2):55-58.
- Tropini C, Earle K, Huang K, Sonnenburg J (2017) The gut microbiome: connecting spatial organization to function. *Cell press.* 21(4):433-442
- Tuailon E, Valea D, Becquart P, Al Tabaa Y, Meda N, Bollore K, Van de Perre P, Vendrell J (2009) Human milk-derived B cells: a highly activated switched memory cell population primed to secrete antibodies. *The journal of immunology.* 0022-1767/09
- Victora C, Bahl R, Barros A, et al (2016) Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms and lifelong effect. *Lancet.* 387: 475-490
- von Mutius E (2017) The shape of the microbiome in early life. *Nature Medicine* 23, 274–275 (2017) doi:10.1038.
- Vukavic T (1983) Intestinal absorption of IgA in the newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2: 248–51.
- Wang Y, Llu L, Moore D, Shen X, Peek R, Acra S, Li H, Ren X, Polk D, Yan F (2017) An LGG-derived protein promotes IgA production through upregulation of APRIL expression in intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol.* 10(2):373-384
- Woof J & Russell M (2011) Structure and function relationships in IgA. *Mucosal immunology.* 4 6:590-597.
- Wu R, Abdullah M, Maattanen P, Pilar A, Scruten E, Johnson-Henry K, Napper S, Brien C, Jones N, Sherman P (2017) Protein kinase C delta signaling is required for dietary prebiotic- induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. *Sci Rep* 7:40820
- Yamada C, Gotoh A, Hattie M, Stubbs K, Katayama-Ikegami A, Hirose J, Kurihara S,

- Arakawa T, Kitaoka M, Okuda S, Katayama T, Fushinobu S (2017) Molecular Insight into Evolution of Symbiosis between Breast-Fed Infants and a Member of the Human Gut Microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell chemical biology*. Volume 24, Issue 4, p515–524.
- Yang Z, Zhao Q, Gao Y, Zhang W (2016) Combined oral and intravenous immunization stimulates strong IgA responses in both systemic and mucosal compartments *PLOS ONE* 11(12): e0168037
- Yekyung Seong, Nicole H. Lazarus, Lusijah Sutherland, Aida Habtezion, Tzvia Abramson, Xiao-Song He, Harry B. Greenberg, Eugene C. Butcher (2017) Trafficking receptor signatures define blood plasmablasts responding to tissue-specific immune challenge. *JCI insight* 2(6):e90233.
- Yoo E & Morrison S (2005) IgA: an immune glycoprotein. *Clinical Immunology*. 116 1: 3-10.
- Zhou Y, Kipps T, Zhang S (2017) Wnt5a signaling in normal and cancer stem cells. *Stem cells int*. 5295286.
- Ziliak S (2017) P values and the search for significance. *Nature methods*. 14(1): 3-4.

11.ANEXOS

11.1 Cuestionario clínico del expediente de la madre

PROTOCOLO

"Cuantificación de IgA1 e IgA2 en calostro y su asociación con el número de enfermedades infecciosas durante el embarazo en diferentes compartimentos del SIM"

Nombre de la madre: _____

Edad de la madre: _____

Expediente de la madre: _____

Considerando los últimos 6 meses de su embarazo, coloque un **círculo** sobre su respuesta e indique el número de veces en las ocurrió el padecimiento.

Infecciones de vías respiratorias altas y bajas

			No. de veces
Faringitis	Si	No	#
Laringitis	Si	No	#
Sinusitis	Si	No	#
Otitis aguda media	Si	No	#
Bronquitis	Si	No	#
Neumonía	Si	No	#

Infecciones Gastrointestinales

			No. de veces
• Diarrea	Si	No	#
• Infecciones por parásitos:	Si	No	#
<i>Gardia lamblia</i>	Si	No	#
Amibiasis	Si	No	#
Otros	Si	No	#

¿Cuáles?

			No. de veces
• Gastroenteritis infecciosa	Si	No	#
<i>Salmonella</i>	Si	No	#
<i>E. coli</i>	Si	No	#
<i>Brucella</i>	Si	No	#
<i>Campilobacter</i>	Si	No	#
• Enfermedad celiaca	Si	No	#

Infecciones Urogenitales

			No. de veces
Infecciones de vías urinarias	Si	No	#
Cistitis	Si	No	#
Pielonefritis	Si	No	#

Infecciones en la piel

			No. de veces
Micosis cutánea	Si	No	#
Infecciones bacterianas en la piel	Si	No	#
Pénfigo	Si	No	#
Vitiligo	Si	No	#

Enfermedades autoinmunes• **Sistémicas**

	No. de veces		
	Si	No	#
Artritis reumatoide	Si	No	#
Lupus Eritematoso Sistémico	Si	No	#
Púrpura trombocitopénica	Si	No	#
Psoriasis	Si	No	#

• **Órgano-específico**

	No. de veces		
	Si	No	#
Tiroiditis autoinmune	Si	No	#
Anemia perniciosa	Si	No	#
Enfermedad de Crohn	Si	No	#

Alergias No. de veces

	Si	No	#
Alergia no especificada	Si	No	#
Asma	Si	No	#
Conjuntivitis alérgica	Si	No	#
Rinitis alérgica	Si	No	#
Alimentos	Si	No	#

Conjuntivitis infecciosa

	No. de veces		
	Si	No	#
Conjuntivitis infecciosa	Si	No	#

Enfermedades febriles

	Si	No	#
Enfermedades febriles	Si	No	#

¿Ha consumido o ha estado consumiendo medicamento o vitaminas en los últimos 6 meses del embarazo?

	Si	No	#
¿Ha consumido o ha estado consumiendo medicamento o vitaminas en los últimos 6 meses del embarazo?	Si	No	#

¿Cuáles?

Esquema de vacunación

De acuerdo al sistema nacional de vacunación especifique si ha recibido alguno de los siguientes refuerzos en los últimos 5 años:

	No. de veces		
	Si	No	#
Td (Tétanos, difteria)	Si	No	#
SR (Sarampión, rubeola)	Si	No	#
Antihepatitis (Hepatitis B)	Si	No	#
Tdpa (Tétanos, difteria, tos ferina)	Si	No	#
Antiinfluenza (Influenza)	Si	No	#
Antineumocócica polivalente (Infecciones por neumococo)	Si	No	#

TORCH:

(Toxoplasma Si No) (Rubeola Si No) (Citomegalovirus Si No) (Herpes Si No)

	No. de veces		
	Si	No	#
Candidiasis vaginales	Si	No	#
Vaginosis bacteriana	Si	No	#

Otras:

Otros padecimientos no especificados

Antecedentes familiares:

Mencione si alguno de sus familiares en primer grado (Madre, Padre, Hermanos o Hijos) presenta o ha presentado alguna enfermedad de la lista anterior.

Familiar	Enfermedad

En caso de embarazos previos, mencione si sus hijos presentaron infecciones de vías aéreas o gastrointestinales de repetición.

Hijo (Según orden de nacimiento)	Enfermedad
Primero	
Segundo	
Tercero	
Cuarto	
Quinto	
Sexto	

11.2 Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Cuantificación de IgA1 e IgA2 en calostro y su asociación con el número de enfermedades infecciosas durante el embarazo en diferentes compartimientos del SIM”

Investigador principal: _____

Sede donde se realizará el estudio: _____

Teléfono: _____

Investigador asociado: Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Sede donde se localiza: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)

Teléfono y horario donde localizarlo: Tel. 57473800 Ext. 5020 en un horario de 11:00 a 18:00 horas de lunes a viernes.

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La mayoría de los pacientes con deficiencia selectiva de anticuerpos tipo A no son diagnosticados y 50% de los casos presenta infecciones recurrentes de vías respiratorias altas (otitis, sinusitis), vías respiratorias bajas (bronquitis y neumonías), gastrointestinales y manifestaciones autoinmunes en el 30% de los casos.

El bebé no producirá anticuerpos tipo A detectable hasta el tercer mes de vida, razón por la que el calostro (sustancia que segrega el pecho los primeros días después del parto) es fuente indispensable de anticuerpos para el lactante. La mayor concentración de los anticuerpos detectadas durante las primeras 24 a 48 horas en calostro humano corresponde a los anticuerpos tipo A.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos:

1. Detectar a las madres con enfermedades tipo infecciosas en población mexicana
2. Detectar y cuantificar los anticuerpos presentes en calostro, principalmente IgA1 e IgA2
3. Asociar el número y tipo de infección en usted con los niveles de anticuerpos tipo A.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

El beneficio que esperamos tener al llevar a cabo este proyecto es entender mejor los mecanismos de transferencia materna a través de anticuerpos en el calostro y como estos niveles presentan variaciones durante infecciones en el embarazo por un método no invasivo.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio le pediremos lo siguiente:

1. Una muestra de 1 a 1.5mL de calostro, misma que no tendrá ninguna consecuencia.
2. Que responda un breve cuestionario referente al número y tipo de infecciones sufridas en los últimos 6 meses.

ACLARACIONES

Ni usted ni su hijo(a) recibirán pago alguno por participar en este estudio, pero tampoco representará ningún costo para usted. Asimismo, le ofrecemos revisar y discutir con usted los resultados encontrados.

Usted no está obligado a participar en este estudio y puede retirarse en cualquier momento. Si Usted decide no participar, su relación con los doctores o el Hospital _____ no cambiará de ninguna manera y seguirán recibiendo los mismos tratamientos y cuidados médicos disponibles en el hospital.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicado o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento informado.

Firma del participante o del padre o tutor. Fecha

Testigo
Domicilio
Parentesco

Testigo
Domicilio
Parentesco.

En esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr. (a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Firma del investigador. Fecha.

11.3 Preparación de soluciones

Reactivo de Bradford*

Coomassie brilliant blue G-250.....	100 mg
Etanol (EtOH) a 95 %.....	5 mL
Ácido fosfórico concentrado.....	100 mL
Agua destilada.....	c.b.p.
200 mL	

*Reactivo debe ser diluido 1 parte de reactivo en 5 partes de agua destilada para usarse.

Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4

Cloruro de sodio (NaCl).....	137 mM
Cloruro de potasio (KCl).....	2.7 mM
Fosfato de sodio difásico (Na ₂ HPO ₄)	4.3 mM
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	1.4 mM
Agua destilada	

Solución PBS-Tween para lavado

Solución de PBS.....	c.b.p.
Polioxietilensorbitanmonolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	0.05 %
Agua destilada	

Solución PBS-Tween para bloqueo para detección de IgA1 e IgA2

Solución de PBS.....	c.b.p.
Polioxietilensorbitanmonolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	0.05 %
Agua destilada	

Solución de bloqueo BSA en PBS para detección de IgG e IgM

Solución de PBS.....	c.b.p.
Albúmina sérica bovina (BSA).....	5 %

Solución de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina

3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) ($C_{16}H_{20}N_2$)1 mg/mL

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)0,012 %

Preparar al momento de usarla

Solución de parado

Ácido sulfúrico (H_2SO_4)0,2 M

Agua destilada

El jurado designado por el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la tesis que presenta para su examen final de **Maestría en Ciencias** en la especialidad de Biomedicina Molecular al **C. Erick Saúl Sánchez Salguero**, el día 14 de agosto del 2017.

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Tutor

Dr. Vianney Francisco Ortíz

Navarrete

Asesor

Dr. Marco Antonio Vega López

Asesor