

IgA ANTIBODIES TO ESCHERICHIA COLI IN SALIVA FROM PATIENTS WITH HIV INFECTION.

- **ESCALONA L.A, WARNER N.A, TORO M, GREGORY R.L.** Universidad Central de Venezuela, Caracas y Universidad de Indiana, Indianapolis.

RESUMEN

Se ha demostrado que el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Este síndrome está caracterizado por la reducción de células T CD4+ lo que conduce a una severa inmunosupresión. Las infecciones oportunistas de las superficies mucosas sugieren la existencia de fallas en el sistema inmune secretor. Numerosos estudios han demostrado que la inmunoglobulina A secretora (IgAs) es la inmunoglobulina predominante de las secreciones mucosas y está asociada con la resistencia y eliminación de agentes infecciosos a nivel de estas superficies. Escherichia coli es un patógeno gram-negativo que forma parte de la flora normal del tracto intestinal. E. coli es un antígeno no relacionado con el VIH, está presente en todos los sujetos, y ha sido posible detectar anticuerpos de IgA en suero y secreciones como la saliva. contra este patógeno. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de anticuerpos salivales de IgA contra E. coli en pacientes con infección por VIH en varios estadios de la enfermedad. Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para medir los niveles de anticuerpos de IgA contra E. coli en saliva total no estimulada de 53 individuos: 18 VIH⁻ (grupo A), 17 VIH⁺ con cuentas totales de células CD4⁺ < 200 mm³ (grupo B), y 18 VIH⁺ con cuentas totales de células CD4⁺ > 200 mm³ (grupo C). Se observó un ligero incremento ($p= 0.06$) de anticuerpos de IgA contra E. coli en la saliva total del grupo C (0.271) sobre el grupo A (0.206) y el grupo B (0.200). Estos resultados indican un ligero incremento en los niveles de anticuerpos de IgA contra E. coli en sujetos VIH⁺ con cuentas totales de células CD4⁺ > 200 mm³, sugiriendo una activación policlonal de las células B en sujetos VIH⁺.

Palabras**claves:**

Saliva,

VIH,

IgA.

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus (HIV) was shown to be the cause of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). This syndrome is characterized by depletion of CD4 T cells, leading to severe immunosuppression. The opportunistic infections of the mucosal surfaces suggest that there is also failure of the mucosal immune system. Numerous studies have shown that secretory IgA (sIgA) is the predominant immunoglobulin of mucosal secretions and is associated with clearance and resistance to infectious agents at mucosal surfaces. Escherichia coli, is part of the normal flora of the intestinal tract, and is also a common gram-negative pathogen. E. coli is present in all subjects, is apparently unrelated to HIV infection and IgA antibodies to this bacterium are found in serum and secretions such as saliva. The object of this study was to determine the levels of anti-E. coli salivary antibodies in patients with HIV at various stages of the disease. Therefore, ELISA was used to measure IgA antibody levels to E. coli in whole unstimulated saliva from 53 individuals; 18 HIV⁻ (group A), 17 HIV⁺ CD4 T cell count < 200 mm³ (group B), and 18 HIV⁺ CD4 T cell > 200 mm³ (group C). There was a slight increase ($p = 0.06$) of IgA antibody in whole saliva from group C (0.271 ± 0.14) subjects over group A (0.206 ± 0.12) and B (0.200 ± 0.11) individuals. These results suggest a slight increase of IgA anti- E. coli in HIV⁺ subjects with a total CD4⁺ T cell count > 200 mm³, providing further support for polyclonal B cell activation of HIV⁺ subjects.

INTRODUCCION

El virus de inmunodeficiencia humano (VIH) fue identificado por primera vez en 1983, demostrándose en 1984, que el mismo era el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Este síndrome se caracteriza por la reducción de células T CD4⁺ lo que conduce a una severa inmunosupresión, enfermedades neuro-lógicas, enfermedades oportunistas y neoplasmas (1). El tejido linfoide asociado a las mucosas es el responsable de la mayor parte del tejido inmunológicamente activo en el cuerpo y las infecciones oportunistas de las superficies mucosa encontradas en estos pacientes, sugiere la existencia de fallas en el sistema inmune secretor (2,5). Diversos estudios han demostrado que la IgA secretora (IgAs) es la inmunoglobulina predominante de las secreciones mucosas y está asociada con la resistencia y eliminación de agentes infecciosos a nivel de estas superficies. La IgAs ha sido detectada en saliva, lagrimas, leche materna, calostro, sudor y secreciones que bañan la lámina propia de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario (3). Esta Ig es producida por la activación de las placas de Peyer (PP) en el intestino delgado o su equivalente en el tracto respiratorio (4,5,6). La disminución en la producción de IgAs puede favorecer la colonización y el desarrollo de enfermedades oportunistas en la cavidad bucal (5,7). La interacción entre las células infectadas con el VIH por medio de los receptores CD4⁺, localizados en la superficie de los linfocitos T ayudadores, y el antígeno gp 120 situado en la superficie del virus, juega un papel clave en la mayoría de los procesos inmunológicos, incluyendo la producción de IgA secretora (7,8). Se han reportado anomalías en los niveles de inmunoglobulinas salivales en pacientes infectados con el VIH(9), sugiriendo que las alteraciones en los valores de IgA secretora podrían contribuir a las frecuentes infecciones observadas en estos pacientes. Diversas investigaciones han demostrado una disminución no específica de anticuerpos de IgA sérica e IgAs en saliva de individuos infectados con el VIH(7,10,11). En contraste, las concentraciones de IgA total en el suero se incrementan dramáticamente a medida que el paciente infectado con el VIH progresa hacia el SIDA(10,12). Existen pocos reportes sobre anticuerpos específicos en relación a la inmunidad de las mucosas en pacientes con VIH. La mayoría de ellos están relacionados con los niveles de anticuerpos salivales IgA, IgA1 e IgA2 contra *Candida albicans* y proponen que las alteraciones en la respuesta específica de IgA pueden ocurrir en asociación con la infección del VIH(7). Un estudio examinando anticuerpos específicos contra *S. mutans*, un antígeno no relacionado, encontró que los anticuerpos de IgA1 e IgA2 contra *S. mutans* estaban incrementados significativamente en sujetos VIH⁺ con valores CD4⁺ > 200 mm³, sugiriendo que este incremento puede reflejar una activación policlonal no específica de las células B(12).

Muchas infecciones oportunistas en pacientes con VIH y SIDA son debidas a hongos, protozoarios o patógenos virales, contra los cuales normalmente existe una respuesta inmune efectiva mediada por células. Por otra parte, la inmunidad contra las bacterias es de ambos tipos, humoral y mediada por células y varias complicaciones bacterianas en las infecciones con VIH y SIDA han sido reportadas. *Escherichia coli*, es parte de la flora normal del tracto intestinal, y es además un patógeno gram-negativo. Esta bacteria está presente en todos los sujetos y ha sido posible detectar anticuerpos específicos para la misma en el suero y las secreciones(5). A diferencia de los patógenos periodontales o *C. albicans*, *E. coli* no ha sido implicada en individuos infectados con VIH como un agente infeccioso cuya presencia en la cavidad bucal pareciera estar exacerbada por la infección con VIH. Sin embargo, *E. coli* ha sido aislado de tejidos ulcerados de hombres homosexuales inmunosuprimidos (15). Considerando que la saliva es un fluido del cuerpo de fácil obtención, el estudio de la respuesta inmune contra una microflora particular podría ser utilizada para evaluar la respuesta de IgA. Por lo anteriormente expuesto el objetivo de este estudio fue determinar los niveles de anticuerpos salivales de IgA contra *E. coli* en pacientes con infección por VIH en varios estadios de la enfermedad.

MATERIALES **Y** **METODOS**
Selección de los pacientes.

La población a estudiar consistió en 35 sujetos VIH seropositivos (VIH⁺) y 18 VIH negativos (VIH⁻). El grupo A (VIH⁻) estuvo integrado por 15 individuos del sexo masculino (12 blancos, 2 negros y 1 hispano) y 3 mujeres blancas, con una edad promedio de 27 años . Este grupo fue determinado en base a los resultados obtenidos a través de la prueba ensayo inmunoenzimático (ELISA) contra el VIH. El grupo B (individuos VIH⁺ con cuentas totales de células CD4+ < 200 mm³), consistió en 17 sujetos masculinos (9 blancos, 5 negros y 3 hispanos) con una edad promedio de 34 años. El promedio total de la cuenta CD4+ para este grupo fue 58.4 mm³. El

grupo C (individuos VIH+ con cuenta $CD4^+ > 200 \text{ mm}^3$) consistió de 18 individuos, 16 hombres (13 blancos y 3 negros) y 2 mujeres negras, con una edad promedio de 35 años. El promedio de conteo de células $CD4^+$ para este grupo de estudio fue de 428.7 mm^3 . Las muestras de saliva fueron proporcionadas por el Dr. Ned A. Warner del Departamento de Biología Oral, de la Escuela Dental de la Universidad de Indiana. A cada uno de los pacientes se les realizó una historia médico-dental y se obtuvo un consentimiento firmado para participar en este estudio. Los individuos VIH+ fueron incluidos en el estudio independientemente de la ingesta o no de medicamentos. Se les realizó un examen dental y se excluyeron todos aquellos pacientes que presentaron evidencia clínica de actividad de caries o condiciones gingivales o periodontales severas. Además los individuos con reciente historia de candidiasis bucal u otras infecciones mucosas no fueron incluidos en este estudio.

Recolección de las muestras de saliva.

Todas las muestras de saliva fueron recolectadas entre 10:00 am y 2:00 pm. Para este estudio se utilizó saliva total no estimulada, que fue recolectada por expectoración dentro de tubos cónicos estériles durante 10 minutos y colocados inmediatamente en hielo. Las muestras fueron clarificadas por centrifugación (10.000 g; 10 min) y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

Preparación del ensayo inmuno enzimático (ELISA) para *E.coli*

Los niveles de anticuerpos de IgA contra *E. coli* en saliva fueron determinados utilizando un ensayo inmuno enzimático (ELISA). Las células de *E. coli* fueron crecidas en 500 ml de caldo LB, incubadas a 37°C durante la noche con agitación, y posteriormente centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos. Las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas en 100 ml de solución salina 0.15 M conteniendo 0.9 ml de formaldehído a una concentración de 0.9%. Luego fueron incubadas con formaldehído a temperatura ambiente por 48 h., lavadas con solución salina para remover el formaldehído y luego resuspendidas en solución amortiguadora sodio carbonato/bicarbonato 0.1 M (p.H 9.6). Placas EIA (ICN Biomedicals INC. Aurora, OH) fueron sensibilizadas con 100 l de *E. coli*, diluido en solución amortiguadora carbonato/bicarbonato. Las placas de microtitulación fueron incubadas durante 3 h. a 37°C , luego fueron lavadas tres veces con solución salina Tween (0.05 M NaCl conteniendo 0.5% Tween 20) y posteriormente bloqueadas con 200 μl de albúmina sérica bovina durante 2h. a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C . Las muestras de saliva fueron diluidas 1:10 en solución salina Tween, se agregaron 100 μl de las mismas y se incubaron por 1 hora a 37°C . Posteriormente las placas fueron lavadas tres veces con solución salina Tween, para luego adicionar 100 μl de IgA anti-humana preparada en carnero conjugada con enzima peroxidasa (fragmento $F(ab^1)_2$; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluida 1:1000 en solución salina Tween e incubadas 1h a 37°C . Las placas fueron lavados tres veces en solución salina Tween y luego se adicionó el sustrato OPD (0.024% de H_2O_2 y 0.04% de Ofenilenodiamine 2HCL en buffer citrato pH 5.0) 100 μl en cada pozo. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 60 min. La reacción fue detenida adicionando 100 μl de H_2SO_4 2N. Las lecturas de densidad óptica fueron realizadas en un espectrofotómetro (Molecular Devices CORP., Menlo Park, CA) a 490 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y analizados estadísticamente mediante la prueba de *t* de students.

RESULTADOS

Niveles de IgA total anti <i>Escherichia coli</i> en saliva de pacientes VIH ⁺ e individuos sanos	
Grupos de individuos	Niveles de IgA (Absorbancia 490 nm)
Grupo A (VIH ⁺) (n=18)	0.206 ± 0.122
Grupo B (VIH ⁺ CD4 ⁺ < 200 mm ³) (n=17)	0.200 ± 0.119
Grupo C (VIH ⁺ CD4 ⁺ > 200 mm ³) (n=18)	0.271 ± 0.145

Tabla 1
n= Número de pacientes
Resultados son expresados como media ± ds

Los resultados obtenidos al evaluar los niveles de anticuerpos de IgA total anti *E. coli* en saliva total no estimulada en un grupo de individuos sanos y un grupo de pacientes VIH⁺ con sub población celular CD4⁺ > 200 mm³ y CD4⁺ < 200 mm³ puede observarse en la tabla No 1.

Los valores de absorbancia para la IgA total entre el grupo de pacientes VIH⁺ CD4⁺ > 200 mm³ (media + ds = 0.271 ± 0.145) fue ligeramente mayor (p- 0.06), aunque no estadísticamente significativos, cuando son comparados con los individuos del grupo B (0.200 ± 0.119) y el grupo control (0.206 ± 0.122).

DISCUSION

Se ha reportado que el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida está asociado con un aumento en los niveles de IgA total en suero o una disminución de las concentraciones de IgAs (6,16). Estas anomalías en los niveles de inmunoglobulina salival en pacientes infectados con VIH sugieren mayor susceptibilidad a enfermedades de las mucosas relacionadas con enfermedades oportunistas. Reportes de anticuerpos específicos en relación a la inmunidad de las mucosas en infección con VIH, específicamente en los niveles salivales de anticuerpos de IgA, IgA1 e IgA2 contra *Candida albicans* indicaron alteraciones en la respuesta específica de IgA(7). Otro estudio¹³ examinando anticuerpos específicos contra *S. mutans*, un antígeno no relacionado con VIH, demostró que anticuerpos de IgA1 e IgA2 estaban significativamente incrementados en sujetos VIH⁺ con conteo de células T CD4⁺ > 200 mm³. Estos resultados pudieran reflejar una activación policlonal no específica de las células B. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de anticuerpos salivales de IgA contra *E. coli* en pacientes con infección por VIH en varios estadios de la enfermedad para observar la respuesta inmune mucosa en este grupo de individuos. *E. coli*, es parte de la flora normal del tracto intestinal, está presente en todos los sujetos y anticuerpos IgA y anticuerpos IgA salivales contra esta bacteria han sido detectados en secreciones y suero⁵. Anticuerpos de IgA salival contra *E. coli* se han detectado consistentemente en niños a la edad de dos meses. La magnitud de la respuesta puede estar influenciada por la intensidad de la exposición a *E. coli* (17). A diferencia de los patógenos periodontales o *C. albicans*, *E. coli* no ha sido implicado, como un agente infeccioso cuya presencia en la cavidad bucal parezca ser exacerbado en la infección por VIH. En este estudio, en la saliva total no estimulada, se determinó un ligero incremento de anticuerpos de IgA contra *E. coli* en sujetos con conteo de células T CD4⁺ > 200 mm³ en comparación con los individuos VIH⁺ con subpoblación celular CD4⁺ < 200 mm³. Esta tendencia al incremento en los niveles de inmunoglobulina contra un antígeno no relacionado puede ser debido a anomalías inmunológicas que afectan en alguna medida todas las células del sistema inmune. Uno de los principales blancos del VIH son los linfocitos T ayudadores, pero también pueden ser observados cambios en la respuesta de los linfocitos B(18). Boyd and James (19) reportaron que

algunos de los defectos sobre las células B son: incremento en la activación policlonal, incremento en los niveles de inmunoglobulina en suero, fallas en la respuesta inmune primaria y secundaria a los antígenos e incremento en la proporción de células inmaduras en la circulación. Algunos péptidos de VIH, como la porción carboxilo terminal de gp41 pueden inhibir la actividad celular de las células NK las cuales son importantes reguladoras de la actividad de las células B(20). Cuando esta función reguladora es suprimida, una de sus consecuencias podría ser la proliferación no controlada de células B. Otro estudio²¹, propone que la respuesta de las células B puede ser el resultado de anomalías en la regulación de las citoquinas como la IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6 que son sintetizadas y secretadas por las células T CD4⁺, y son responsables del cambio de transporte isotópico y secreción para la IgA. La disminución de las células T CD4⁺ podría causar una disminución en la producción de citoquinas, con el resultado de una inapropiada respuesta inmune de las mucosas. Aunque no existe evidencia directa de que el VIH puede infectar a los linfocitos B, la presencia de antígenos virales conduce a alteraciones en su función. Shirai *et al* (22) demostraron que cambios cualitativos y cuantitativos en la activación de las células B acompañan y pueden ser predictivos de progresión de la enfermedad en individuos infectados con VIH. Estos investigadores estudiaron linfocitos de pacientes VIH⁺ para determinar el número y especificidad de las células secretando inmunoglobulinas, encontrando una respuesta específica de IgG contra el virus y una respuesta policlonal de IgM e IgA. Esta activación policlonal varió en función del conteo de las células T CD4⁺ y se incrementó entre pacientes con enfermedad avanzada. Además la frecuencia de células B produciendo anticuerpos contra antígenos virales disminuyó a medida que la enfermedad progresó. Aunque en nuestro estudio utilizamos saliva, en vez de suero, los niveles incrementados de IgA en sujetos con células T CD4⁺ > 200 mm³ son similares a los resultados reportados por otros investigadores(13,23) y consistentes con un proceso de activación policlonal de las células B.

En conclusión, los resultados de este estudio indican un ligero incremento en los niveles de IgA contra *E. coli* en saliva no estimulada de sujetos VIH⁺ con conteo de células T CD4⁺ > 200 mm³, sugiriendo una alteración policlonal en las células B de sujetos VIH⁺.

BIBLIOGRAFIA

1. Levy, JA. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological Reviews* 57:185-288.
2. McGhee, JR, Mestecky, J, Dertzbaugh, MT, Elridge, JH, Hisarawa, M and Kiyono, H. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine. *Developments. Vaccine* 10:75-78.
3. Arnold, RR, Mestecky, J and McGhee, JR. 1985. Naturally occurring secretory Immunoglobulin A antibodies to *Streptococcus mutans* in human colostrum and Saliva. *Infect. Immun.* 14:355-362.
4. Mestecky, J and McGhee, JR. 1987. Immunoglobulin A (IgA): molecular and Cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 40:153-245.
5. Mestecky, J Russell, MW, Jackson, S and Brown, TA. 1986. The human IgA System: a reassessment. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 40:105-114.
6. Gregory, RL. 1994. The biological role and clinical implications of IgA. *Laboratory Medicine* 25:724-728.
7. Coogan, MM, Sweet, SP and Challacombe, SJ. 1994. Immunoglobulin A (IgA) IgA1 and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in Whole and parotid saliva in Human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Infect Immun.* 62:893-896.
8. Gelderblom, HR. 1991. Assembly and morphology of HIV: Potential effect of Structure on viral function. *AIDS*

5:617-638.

9. Müller, F, Frøland, SS, Hvatum, J, Radl, JJ and Brandtzaeg, P. 1991. Both IgA subclasses are reduced in parotid saliva from patients with AIDS. *Clin. Exp. Immunol.* 83:203-209.
10. Sweet, SP, Rahman, D and Challacombe, SJ. 1995. IgA subclasses in HIV disease: Dichotomy between raised levels in serum and decreased secretion rates in saliva. *Immunology* 86:556-559.
11. Jackson, S. 1990. Secretory and serum IgA are inversely altered in AIDS patients. In: *Advances in Mucosal Immunology* (eds T.T. MacDonald, SJ, Challacombe, PW Bland, CR Stokes, RV, Heatly and AM Mowat) p.665. Kluwer Academic Publishers, Lancaster.
12. Phillips, AN, Sabin, CA, Elford, J, Boffill, M, Lee, CA and Janosy, G. 1993. CD8 lymphocyte counts and serum IgA levels early in HIV infection as predictor of CD4 lymphocyte depletion during 8 years of follow-up. *AIDS*. 7:975-980.
13. Warner, NA and Gregory, RL. 1996. Salivary immunoglobulin levels and antibodies to *Streptococcus mutans* in AIDS. *J. Dent. Res.* 75:315.
14. Greenspan, D, Greenspan, J, Schiødt, M and Pindborg, JJ. 1990. Bacterial infections in AIDS and the mouth. *Diagnosis and management of oral lesions.* Munksgaard, Copenhagen. p 103.
15. Greenspan, D, Greenspan, J, Schiødt, M and Pindborg, JJ. 1990. Oral manifestation: classification. In *AIDS and the mouth. Diagnosis and management of oral lesions.* Munksgaard, Copenhagen p.87.
16. Vincent, C, Cozon, G, Zittoun, M, Mellquist, M, Kazatchkine, MD, Czerkinsky, C and Revillard, JP. 1992. Secretory immunoglobulins in serum from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. *J. Clin Immunol.* 12:381-388.
17. Taubman, MA and Smith, DJ. 1993. Significance of salivary antibody in dental Disease. *Ann New York Academy Sciences.* 694:202-215.
18. Berzofsky, JA, Berkower, IJ and Epstein, SL. 1993. Antigen-antibody interactions And monoclonal antibodies. *Fundamental Immunology.* Third edition. Chapter 12:421-465.
19. Boyd, JE and James, K. 1992. B cell responses to HIV and the development of human monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 88:189-202.
20. Chirmule, N, Kalyanaraman, VS, Saringer, C, Wong-Staal, F, Ghayeb, J and Pahwa, S. 1990. Localization of B-cell stimulatory activity of HIV-1 to the Carboxyl terminus of gp41. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 6:299-305.
21. Rosenberg, ZF and Fauci, AS. 1990. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection: cytokine induction of HIV expression. *Immunol Today.* 11:176-180.
22. Shirai, A, Cosentino, M, Leitman-Klinman, SF and Klinman, DM. 1992. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *J Clin Invest.* 89:561-566.
23. Matsuda, S, Oka, S, Honda, M, Takebe, Y and Takemori, T. 1993. Characteristics of IgA antibodies against HIV-1 in sera and saliva from HIV- seropositive individuals in different clinical stages. *Scand. J. Immunol.* 38:428-434.

[HOME](#) > [EDICIONES](#) > [VOLUMEN 37 Nº 1 / 1999](#) >

Artículo
No.

[1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) **[7](#)** [8](#) [9](#) [10](#) [11](#) [12](#) [13](#) [14](#) [15](#) [16](#) [17](#) [18](#)

[▲ Ir al principio](#)