

## Determinación de IgA salival contra la gp120 en pacientes VIH+ y VIH-.

*Recibido para arbitraje: 20/02/2003  
Aceptado para publicación: 25/03/2003*

Escalona LA<sup>1</sup>, Warner NA<sup>2</sup>, Chaiyarit P<sup>2</sup>, Gregory RL<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup>Institute of Dental Research (IIORV), Faculty of Dentistry, Central University of Venezuela, <sup>2</sup>Dept of Oral Biology, School of Dentistry, <sup>3</sup>Dept of Pathology and Laboratory Medicine, School of Medicine, Indiana University, USA.

### RESUMEN

Determinación de IgA salival contra la gp120 en pacientes VIH+ y VIH-

La producción de inmunoglobulina A (sIgA) es uno de los mecanismos a través de los cuales el sistema inmune humoral protege a las superficies mucosas inhibiendo la adherencia de patógenos y neutralizando la acción de los virus. Estudios realizados con individuos VIH+ han demostrado que la IgA se une a las glicoproteínas de la envoltura, gp120 y gp41, del virus VIH-1. **Objetivo:** El propósito de este trabajo fue detectar los niveles de IgA salival contra 50 péptidos que representan la gp120 de la envoltura del virus VIH-1 y están constituidos por secuencias de 20 aminoácidos. **Materiales y métodos:** Se utilizó la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) con saliva total no estimulada de 24 sujetos, que fueron divididos en tres grupos: 9 VIH+CD4>200 mm<sup>3</sup>; 10 VIH+CD4<200 mm<sup>3</sup> y 5 VIH-. Los péptidos utilizados cubrieron el espectro de 510 aminoácidos de la gp120. **Resultados:** Los resultados demostraron que los niveles de IgA específica fueron significativamente mayores ( $p=0.0001$ ) en el grupo VIH+ que en el grupo VIH-. No se observaron diferencias significativas entre los grupos VIH+CD4>200 mm<sup>3</sup> y VIH+CD4<200 mm<sup>3</sup>. No se observó correlación significativa entre el conteo CD4+ y las respuestas de IgA. Los péptidos con mayor número de respuestas en el grupo VIH+ correspondieron a las regiones C1, V2 y C3. **Conclusiones:** Los niveles de IgA salival observados en este estudio no mostraron variabilidad en relación con el conteo de células CD4+ y los péptidos que provocaron mayores respuestas de anticuerpos correspondieron a regiones con poca variabilidad sobre la cubierta del virus.

Palabras claves: HIV-1, HIV envelope gp120, HIV antibodies, saliva IgA.

### ABSTRACT

Salivary IgA antibodies to gp120 from HIV+ and HIV- patients.

Escalona LA<sup>1</sup>, Warner NA<sup>2</sup>, Chaiyarit P<sup>2</sup>, Gregory RL<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup>Institute of Dental Research (IIORV), Faculty of Dentistry, Central University of Venezuela, <sup>2</sup>Dept of Oral Biology, School of Dentistry, <sup>3</sup>Dept of Pathology and Laboratory Medicine, School of Medicine, Indiana University, USA.

The production of immunoglobulin A (sIgA) is one of the mechanisms through which the humoral immune system protects the mucosal surfaces. Studies on HIV+ individuals have shown binding of IgA to HIV-1 envelope glycoproteins, gp120 and gp41. Objective:

The purpose of this work was to detect levels of salivary IgA antibodies against fifty 20-mer overlapping peptides representing the HIV-1 gp120 envelope protein. Methods: Using enzyme-linked immunoabsorbent assay, whole unstimulated saliva from 24 subjects was used and divided in three groups: 9 HIV+CD4>200 mm<sup>3</sup>; 10 HIV+CD4<200 mm<sup>3</sup> y 5 HIV-. The peptides used covered the 510 aminoacids from HIV-1 gp120 envelope. Results: The levels of IgA in unstimulated whole saliva were significantly higher in the HIV+ patients than in the HIV- subjects (p=0.0001). There were no significant differences found between the CD4>200 cell/mm<sup>3</sup> HIV+ group compared to the CD4<200 cell/mm<sup>3</sup> HIV+ group. There were no significant correlation between the IgA levels and the CD4 counts. The peptides corresponding to the regions C1,V2 y C3 had a larger number of high responders from the HIV+ group. **Conclusions:** The levels of IgA observed in this study did not present variation related with decrease of CD4 cell counts and the peptides with higher responses of IgA antibodies were directed toward peptides representing the regions with less variability on the viral glycoproteins envelope.

Aunque mucho se ha descubierto y aprendido en los últimos años sobre el Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y su agente causal el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la patogénesis de la infección no está aún totalmente entendida. Una transmisión viral exitosa requiere de la interacción del virus con receptores sobre la superficie celular, posterior fusión y entrada del virus a la célula. Esto ocurre a través de las glicoproteínas de superficie del virus, gp 120 y gp 41, las que se unen a la molécula CD4 de la células susceptibles (Dalgeish y col. 1984)<sup>1</sup>. Estas células incluyen a los linfocitos T ayudadores, monocitos, macrófagos, células microgliales y células de Langerhan, además de otras células como las células asesinas naturales (NK), fibroblastos de la piel, células dendríticas foliculares, líneas celulares trofoblásticas, células epiteliales de riñones y bazo, hepatocitos y células neuronales (astrocitos y oligodendrocitos).

El VIH-1 es un virus cuya cubierta está constituida por puntas o brotes sobre su superficie que son esenciales para la entrada del virus dentro de las células blanco. La unión del virus a las células blanco tiene lugar a través de una secuencia de eventos entre la gp120 y receptores del virus con la molécula CD4+ y coreceptores, miembros de la familia de las quimoquinas. La molécula CD4+ es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, expresadas principalmente sobre los linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. La glicoproteína de la envoltura del VIH-1 es producida inicialmente como una cadena simple, gp160, la cual es dividida por una proteasa celular. La división de la gp160 produce una glicoproteína de superficie conocida como gp120 y una proteína expandida de transmembrana llamada gp41<sup>2</sup>. La glicoproteína de superficie, gp120, es altamente glicosilada con un contenido de carbohidratos que contribuye entre el 40% al 50% de su peso molecular y está compuesta por cinco regiones constantes (C1-C2-C3-C4-C5) interpuestas con 5 regiones variables (V1V2-V3-V4-V5) Las regiones variables V1-V2-V3 y V4 forman loops que están expuestos y anclados a sus bases por uniones disulfuro<sup>3</sup>.

Estas glicoproteínas tienen también la capacidad de comportarse como antígenos que generan una respuesta inmune mediada por células contra el VIH, jugando un papel significativo en la determinación del curso de la enfermedad. Adicionalmente gp120 y

gp41 participan en la generación de respuestas que producen deterioro del hospedero, ya que tienen la capacidad de disparar respuestas autoinmunes, inhiben la actividad de las células asesinas naturales y aumentan la capacidad de infección por parte del virus. Esta diversidad de respuestas generada por las glicoproteínas gp120 y gp41 ha motivado los estudios para caracterizar los epítopes relevantes de estas moléculas y delinear su rol en la respuesta inmune<sup>4</sup>

Los primeros estudios realizados en pacientes diagnosticados con SIDA e individuos seropositivos para VIH, indican que el sistema inmune humano reacciona vigorosamente a las glicoproteínas de la envoltura (gp120 y gp41), al mismo tiempo que desarrolla anticuerpos contra otras proteínas del virus. Estos estudios sobre VIH-1 fueron realizados con suero de individuos infectados utilizando péptidos sintéticos para detectar IgG<sup>2,4,5,6,7,8,9</sup>. Los principales sitios de unión con la gp120 se localizaron en las regiones: C1, V2, C2, V3, C3, C3-V4 y en la porción C terminal.

El efecto más dramático de la infección por VIH sobre el sistema inmune es la progresiva pérdida de células T CD4<sup>+</sup>, provocando una disminución de la inmunidad mediada por células. Sin embargo, otros aspectos de la inmunidad celular son también afectados, como es el caso de las células NK, monocitos y macrófagos. Se produce además, una expansión policlonal de las células B, produciendo disfunción de la inmunidad humoral. Estas alteraciones son observadas por un incremento en los niveles de inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA no específicas, especialmente un significativo incremento de IgA en suero<sup>10</sup> el cual ha sido utilizado por algunos investigadores como predictor del progreso de la enfermedad. En contraste, se ha reportado que la IgA de las superficies mucosas, (sIgA) disminuye a medida que ocurre progresión de la enfermedad<sup>11</sup>.

Se han realizado otros trabajos con el propósito de establecer correlaciones entre la reacción de anticuerpos a diferentes péptidos que representan la estructura del VIH-1 y el estadio clínico del paciente, utilizando suero procedente de individuos infectados agrupados de acuerdo a su conteo de células CD4<sup>+</sup><sup>7,19,26</sup>. Los resultados obtenidos en estos estudios indican que el patrón de reactividad de los anticuerpos difiere entre los individuos dependiendo del número de células CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, los sitios de unión para IgA sobre las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1 no han sido identificados en la misma proporción que para la IgG.

Varios isotipos de Igs pueden ser encontrados en las secreciones mucosas cuyas funciones son disminuir la capacidad de los microorganismos de unirse a la superficie epitelial y posteriormente entrar al ambiente interno. Entre los diferentes isotipos de Ig, la IgA es la que se encuentra en mayor concentración en las superficies mucosas en comparación con los otros isotipos, con la excepción de la IgG que es el isotipo predominante en el tracto genital humano<sup>12</sup>. La IgA es predominante en las secreciones intestinales y en saliva, y la IgA secretora contiene una estructura antigénica adicional llamada componente secretorio (CS)<sup>13,14</sup>.

La mucosa bucal es parte de las mucosas que recubre el cuerpo y se encuentra en contacto diario con alimentos y diversos antígenos. Aunque la mucosa bucal muestra similitud con otras partes de la mucosa sistémica, existen algunas diferencias como es la presencia de dientes. La unión entre dientes y mucosa permite un mayor acceso de las proteínas del suero a la superficie mucosa, pero lo más resaltante es la formación de un epitelio, llamado epitelio de unión, el cual enfrenta un gran reto ante la presencia de gran

variedad de microorganismos y es comprometido cuando existe enfermedad periodontal<sup>15</sup>. Algunos de los mecanismos inmunes de defensa de la cavidad bucal son diferentes a los encontrados en otras mucosas, ya que incluyen parte del sistema inmune secretor proveniente de las glándulas salivales mayores y menores, y parte del sistema inmune periférico que es aportado por componentes del suero que son exudados dentro del fluido crevicular o son el resultado de respuestas inmunes locales en los tejidos gingivales y mucosos<sup>16</sup>.

Ya que las superficies mucosas son el principal sitio de entrada para el VIH-1, y las glicoproteínas de la envoltura son el blanco de los anticuerpos neutralizantes, que podrían ser la base del componente humoral de una vacuna, podemos suponer que los anticuerpos IgA desempeñan un papel importante en el desarrollo de la infección. El objetivo de esta investigación es determinar los niveles de IgA salival contra 50 péptidos que representan la gp120 de la envoltura del virus y están constituidos por secuencias de 20 aminoácidos.

## **Materiales y Métodos**

### *Selección de la muestra y colección de la saliva total no estimulada (ST)*

La muestra poblacional estuvo comprendida por 24 individuos. Previa aprobación del Indiana University Medical Center (IUMC) Institutional Review Board (IRB) fue solicitada para el reclutamiento de 19 pacientes VIH+, los cuales fueron divididos en dos grupos: 9 VIH+ con conteo de células T CD4+ mayor de 200/mm<sup>3</sup> (VIH+CD4>200), y 10 VIH+ con conteo de células T CD4 menor de 200/mm<sup>3</sup> (VIH+CD4<200). El grupo control fue constituido por 5 sujetos VIH-, todos los participantes firmaron su consentimiento de colaboración en el estudio. Las muestras de saliva no estimulada fueron colectadas entre las 10 AM y las 2 PM por expectoración en tubos estériles de polipropileno durante 10 minutos e inmediatamente colocadas en hielo por un tiempo no mayor de dos horas y clarificadas por centrifugación a 2.500 xg por 10 minutos. Las muestras de saliva fueron alicuotadas y almacenadas a -70°C hasta el momento de realizar los ensayos.

### *Péptidos.*

50 péptidos constituidos cada uno de ellos por 20 aminoácidos que cubrían todo el espectro de la gp120 en la secuencia del genoma del VIH-1<sub>MN</sub> fueron proporcionados por el NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, USA.

### *Protocolo de ELISA para determinar IgA total en saliva.*

Las concentraciones de IgA total en las muestras de saliva no estimulada fueron medidas por el método de captura. Los niveles totales de anticuerpo fueron cuantificados por el análisis de regresión lineal de los valores de densidad óptica (DO) de las muestras contra una curva estandar compuesta de 10 diluciones seriadas de IgA purificada (Cappels ICN Biomedicals; #55906). Los platos de poliestireno de 96 pozos (EIA Limbo, Flow Laboratories) fueron cubiertos con 100µl/pozo de IgA antihumana preparada en cabra (Sigma; I-0844) diluídas 1:1000 en solución amortiguadora 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.6). Los platos se incubaron por dos horas a 37°C y luego durante la noche a 4°C. Los platos fueron lavados en solución salina Tween y luego bloqueados con albúmina sérica humana (ASH) (Sigma) en una solución amortiguadora 0.1 M

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/Na HCO<sub>3</sub> (pH 9.6) por una hora a temperatura ambiente. La ASH fue removida y diluciones de saliva total, 1:250 en Tween conteniendo 1% de albúmina sérica de bovino (ASB) fueron adicionadas (100µl) e incubadas durante dos horas a 37°C. Los pozos son lavados tres veces en una solución Tween para luego agregar 100µl de peroxidasa conjugada anti IgA (Sigma; A-0295) diluida 1:12000 en solución Tween con 1% de ASB, se incubó a 4°C durante toda la noche. Se lavó durante tres veces con Tween, y se adicionaron 100µl de sustrato que contenía OPD (Sigma), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y solución amortiguadora de citrato 0.05 M, se incubó por treinta minutos. Se paró la reacción colorimétrica agregando 2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se realizó el análisis de absorbancia a 490nm en un lector Thermomax™.

*Protocolo de ELISA para determinar anticuerpos IgA contra los 20-mer péptidos representando la gp120 de la cubierta del virus.*

Los niveles de anticuerpo IgA fueron detectados usando la técnica de inmuno ensayo enzimático (ELISA). Los niveles totales de anticuerpos fueron cuantificados por análisis de regresión lineal de la DO 490 nm de las muestras de los sujetos contra una curva estándar compuesta de 5 diluciones seriadas de un pool de suero de sujetos VIH+. Para remover anticuerpos IgG que pudieran interferir, las muestras de suero fueron tratadas con Gullisorb (Gull Laboratories, Salt Lake City, UT USA), 10µl de Gullisorb/100µl de suero.

Placas de poliestireno de 96 pozos para ELISA (COSTAR® EIA/RIA plates-9018, Corning Incorporated, NY) fueron cubiertos con 100µl del péptido sintético (1 µg/ml) diluido en una solución amortiguadora de carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6), incubados por 1 hora a 37°C y luego a 4°C durante toda la noche. Los platos fueron lavados tres veces con una solución salina 0.05 M conteniendo Tween 20, y luego bloqueados con una solución carbonato buffer con 5% de leche deshidratada (200µl) por una hora a temperatura ambiente. Las muestras de saliva fueron diluídas 1:40 en 0.05 M Tween conteniendo 2% de ASB. El bloqueador fue removido y se adicionaron 100µl de las muestras de saliva diluídas, se incubaron durante 1 hora a 4°C, se lavaron los platos tres veces en una solución Tween 0.5M, para luego agregar 100µl de IgA antihumana conjugada con biotín (Sigma) diluído 1:2000 en 0.5 M Tween con 5% de leche deshidratada. Después de incubar durante 1 hora a 4°C, los platos fueron lavados tres veces con Tween 0.5 M y se colocaron 100µl de peroxidasa conjugada con avidina (Sigma) diluído 1:1000 en Tween 0.05 M e incubados por una hora a 4°C. Después de lavar tres veces en solución Tween 0.05 M, se adicionaron 100µl de sustrato conteniendo una tableta de OPD (Sigma), 14 µl de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) y 20 ml de citrato buffer 0.05 M (pH 5.0), se incubó durante 30 minutos y se paró la reacción con 100µl de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La absorbancia fue medida en un lector de ELISA Thermomax™ (Molecular Devices Merb Park) a 490 nm.

*Análisis estadísticos.*

- Los valores de la densidad óptica (DO) y las unidades ELISA (UE) a través de todos los péptidos fueron comparados entre los grupos VIH+CD4<200, VIH+CD4>200 y los sujetos control utilizando análisis de varianza (ANOVA).

.- El test de student fue utilizado para comparar: a) los valores OD y EU entre los grupos VIH+ y VIH-, b) los valores de IgA específica contra los péptidos representando la gp120, entre los individuos VIH+CD4<200 cell/mm<sup>3</sup> y los VIH+CD4>200 cell/mm<sup>3</sup>, c) los niveles de IgA total en las muestras de saliva entre los grupos VIH+CD4<200 cell/mm<sup>3</sup> y los VIH+CD4>200 cell/mm<sup>3</sup>.

.- El coeficiente de correlación del rango Spearman fue utilizado para determinar asociaciones entre el contejo CD4 y los valores en ELISA DO y UE para IgA total e IgA contra los diferentes péptidos de VIH.

.- Se consideraron positivas las muestras que alcanzaron 2 desviaciones estandars por encima del promedio de los sujetos VIH- para cada péptido. Se utilizó el factor de corrección Bonferroni.

## RESULTADOS

A través de todos los análisis se pudo observar gran variabilidad interindividual en los niveles de anticuerpos IgA total e IgA específica contra los diferentes péptidos en los tres grupos de estudio.

Los niveles de IgA en saliva total no estimulada fueron determinados por ELISA y pudimos observar que los pacientes con contejo celular VIH+CD4>200/mm<sup>3</sup> presentaron niveles mas elevados de IgA que los pacientes VIH+CD4<200 /mm<sup>3</sup>, pero la diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa (Tabla1).

Tabla 1  
Niveles de IgA total en saliva no estimulada en pacientes VIH+

	Promedio	SE
VIH+CD4>200/mm <sup>3</sup>	3217	1111
VIH+CD4<200 /mm <sup>3</sup>	1947	478

P≤ 0.3164

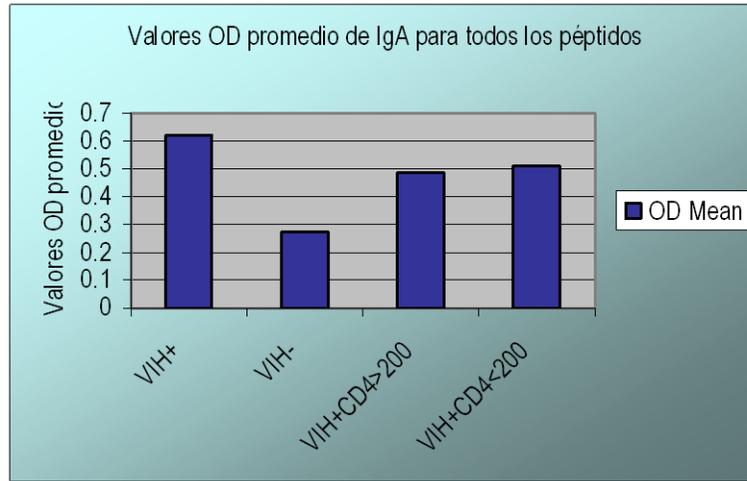
Los niveles de IgA salival fueron medidos contra 50 aminoácidos representando la gp120 por la técnica de ELISA. Los resultados obtenidos por ANOVA para todos los péptidos muestran que el grupo VIH+ presentó valores DO mayores que el grupo VIH- (p=0.0001), pero no se observaron difrencias significativas para UE (p=0.85). No se observaron diferencias significativas entre el grupo VIH+CD4<200/mm<sup>3</sup> y el VIH+CD4>200/mm<sup>3</sup> para valores DO (p=0.21) o UE (p=0.73). (Tabla2, Fig.1)

Tabla2  
Valores ELISA DO de anticuerpos IgA para los péptidos representando la gp120 del VIH-1

	Promedio	SE
VIH+	0.620869034	0.0033359
VIH-	0.272897778	0.0017388
VIH+CD4<200 /mm <sup>3</sup>	0.509330871	0.0012156
VIH+CD4>200/mm <sup>3</sup>	0.486407206	0.0011609

p-value entre el grupo VIH+ y el VIH- = 0.0001

Figura1



Sin embargo, observamos niveles significativamente elevados de IgA contra seis péptidos en el grupo VIH- en comparación con el VIH+. Estos péptidos representan las siguientes regiones de la glicoproteína 120 de la envoltura del virus VIH-1: 61-80(C1), 191-205(V2-C2), 201-220 (C2), 261-280 (C2), 471-490 (C5) y 481-500 (C5). Esto significa que los pacientes VIH- respondieron con bastante intensidad a varios de los péptidos utilizados.

(Fig 2)

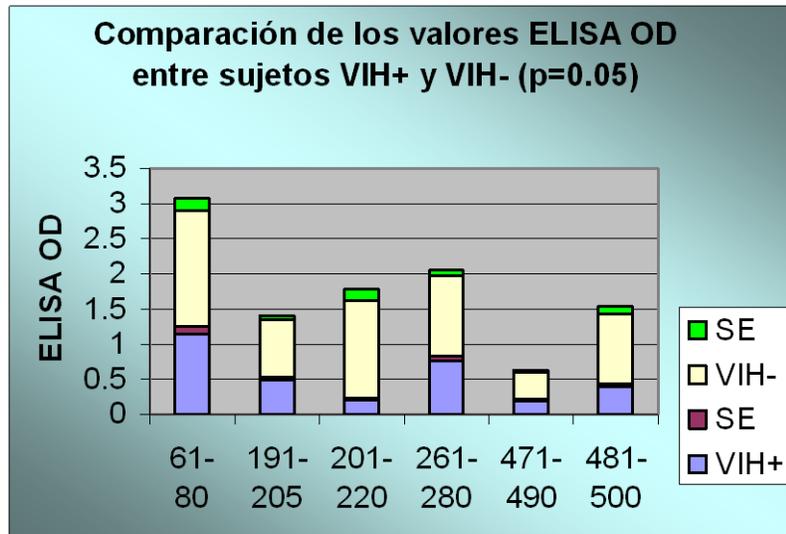


Figura 2

Con el propósito de conocer si existió correlación entre los valores ELISA DO y UE para cada péptido y el conteo CD4 en el grupo VIH+, se utilizó el Spearman rank correlation coefficient. Sólo cinco péptidos mostraron correlación entre los niveles de anticuerpos IgA y el conteo de células CD4 (Tabla 3), estos péptidos representaron aproximadamente el 10% de los péptidos utilizados en este estudio y correspondieron a las regiones C1, V2, C2 y C3. El péptido correspondiente a la porción variable V2 (171-190) fue el que presentó mayor correlación con el conteo CD4, los otros se localizaron en regiones constantes, con poca variabilidad, de la glicoproteína gp120.

Tabla 3

Correlación de valores de ELISA con el conteo CD4*		
	Péptidos	
101-120 (C1)		0.49
171-190 (V2)		0.66
181-200 (C2)		0.5
271-290 (C2)		0.55
371-385 (C3)		0.5

Correlación significativa superior a 0.46 (p<0.05)

Para determinar cuantos individuos VIH+ presentaban valores de ELISA 2 desviaciones estandar por encima del promedio VIH- para cada péptido, se usó el factor de corrección Bonferroni. Los péptidos 27-35 y 91-110 mostraron el mayor número de individuos con respuestas elevadas en el grupo VIH+ CD4>200 células/mm<sup>3</sup> en comparación con el grupo VIH+ CD4<200 células/mm<sup>3</sup>. El resto de los péptidos tuvo un número similar y uniforme de respuestas entre ambos grupos (Tabla 4).

Tabla 4

Número de sujetos VIH+ con altas respuestas a los péptidos representando la gp120						
	N	PEPTIDOS				
		27-35	91-110	101-120	161-180	361-380
VIH+ CD4>200	9	2	2	7	7	9
VIH+ CD4<200	10	5	5	8	8	8
Total VIH+	19	7	7	15	15	17
Total VIH-	5	0	0	0	0	0

## DISCUSION

En el presente estudio, se determinaron anticuerpos IgA en saliva de pacientes VIH+ contra 50 péptidos constituidos por secuencias de 20 amino ácidos representando la glicoproteína gp120 de la envoltura del virus VIH-1<sub>MN</sub>. Debido a que las superficies

mucosas son la principal puerta de entrada para el virus VIH-1 se piensa que los anticuerpos IgA juegan un papel importante para el desarrollo de la infección<sup>17</sup>, ya que su principal función es bloquear la adherencia de patógenos a la superficie mucosa. Recientemente Kaul et al.,<sup>18</sup> encontraron que el fluido proveniente del tracto genital de un grupo de trabajadoras sexuales eran resistentes a la infección por VIH-1, y presentaban elevadas cantidades de anticuerpos IgA específica contra el virus, mientras que en mujeres infectadas por el virus las concentraciones de ésta inmunoglobulina eran bastante bajas.

En nuestro estudio se determinaron los niveles de IgA total en saliva mixta no estimulada obtenida de 19 pacientes VIH+ clasificados en dos grupos: 9 VIH+ con conteo celular CD4+ >200 mm<sup>3</sup> y 10 VIH+ con conteo celular CD4<200 mm<sup>3</sup>. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de IgA total en saliva no estimulada para ambos grupos, coincidiendo con datos obtenidos en otros estudios<sup>7,17,19,20</sup>, donde no se observaron variaciones relacionadas con progresión de la enfermedad medida por la disminución del conteo de células CD4, aunque ha sido reportado por otros investigadores una reducción en las concentraciones de IgA salival como resultado de la infección por VIH-1<sup>11,21,22</sup>. Estos resultados inconsistentes relacionados con los niveles totales de IgA salival en sujetos infectados, podrían ser debido a una posible alteración en la regulación de IgA, diferentes métodos utilizados para cuantificar los niveles de IgA, diferente tamaño de las muestras y a la elevada variabilidad interindividual observada en los valores ELISA, posiblemente relacionada a la composición y tasa de secreción del flujo salival para cada sujeto.

Los niveles de IgA a través de todos los péptidos mostró valores de IgA mas elevados en los pacientes VIH+ que para el grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos VIH+CD4<200 y VIH+CD4>200, resultados estos que concuerdan con los niveles de IgA total obtenidos en nuestras muestras de saliva.

Los péptidos que captaron mayores cantidades de IgA correspondieron a regiones constantes de la glicoproteína como fueron; C1(61-80), C2-V2(191-205), C2(201-220, 261-280), C5(471-490, 481-500). Es importante resaltar que estos valores elevados de IgA fueron encontrados en el grupo VIH- y pudieran ser debido a interacciones específicas de los anticuerpos de IgA contra antígenos ambientales con componentes de los péptidos sintéticos o a la existencia de regiones homólogas entre las glicoproteínas del virus y proteínas propias del hospedero<sup>4,23,24</sup>.

En nuestro trabajo, nueve péptidos homólogos con las regiones C1 (27-35, 91-110, 101-120), V2 (161-180) y C3 (361-380) provocaron el mayor número de respuestas en el grupo VIH+, a diferencia de los obtenidos por Matsuda y Noda<sup>25</sup>, quienes encontraron que los péptidos representantes de las regiones C3-V4 (341-376) sobre gp120 y el péptido ELDKWA sobre gp41 fueron las principales regiones de unión para IgA salival. Sin embargo, Skott et al.,<sup>21</sup> mostraron que la reactividad de sIgA se dirigía principalmente a los péptidos de la región V4(385-409) y la porción C-Terminal del espiral V3 (325-344), sin mostrar reactividad a los péptidos que representan la porción central del loop V3. Como podemos observar, las regiones contra las cuales se dirigen los anticuerpos IgA en saliva, no son los mismos que se han reportado en los diferentes estudios para IgG, en saliva y suero, los cuales se producen contra los péptidos que representan el loop V3 de la gp120(300-330)<sup>23,26</sup>. Estos resultados sugieren una alteración

en la especificidad para el isotipo IgA. La especificidad de las inmunoglobulinas se debe a diferente afinidad con los antígenos virales que puede ser afectada por las cadenas de carbohidratos las cuales influyen la reacción inmune<sup>4,27</sup>. Laal et al.,<sup>6</sup> refieren que los residuos de carbohidratos son esenciales para el reconocimiento directo o indirecto. Con respecto a este punto es de interés resaltar que en nuestro estudio, los péptidos con alta respuesta de IgA, en ambos grupos VIH- y VIH+, contenían uno o ningún sitio glicosilado.

La correlación más significativa entre el conteo de células CD4+ y las respuestas de IgA fueron encontradas con los péptidos representando las regiones C1, V2, C2 y C3, siendo el péptido 171-190 (V2) el que presentó mayor correlación (0.66). Estos péptidos representan sólo el 10% de los utilizados en esta investigación, y aunque no se encuentra en la literatura ningún reporte con respecto a este parámetro, podrían explicarse estos resultados por los niveles de IgA encontrados entre los diferentes grupos VIH+, los cuales como se señaló anteriormente no presentaron variaciones relacionadas con la progresión de la enfermedad, medida por el conteo de células CD4+. En suero los niveles de IgA contra péptidos representando la secuencia de aminoácidos de la gp160 del virus VIH-1, muestran un comportamiento diferente<sup>26</sup>, ya que se incrementan con la disminución de las células CD4+, mientras que los niveles de IgA e IgM se mantienen estables durante el avance de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los niveles de IgA en saliva total no estimulada en individuos infectados por el VIH-1 no presentaron variaciones relacionadas con la progresión de la enfermedad. En contraste con los niveles de IgG e IgA en suero, los anticuerpos de IgA en saliva en sujetos VIH+ fueron dirigidos hacia péptidos representando regiones con menos variabilidad sobre la envoltura del virus. Sería de gran importancia conocer si la antigenicidad de estos péptidos está correlacionada con actividad neutralizante, por lo tanto es necesario realizar mayores investigaciones sobre la especificidad de la IgA salival, para entender como la infección por VIH-1 afecta la respuesta inmune humoral en humanos y para el diseño de vacunas contra este virus.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dalgeish AG, Beverly PC, and Clapham PR. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984. 312:763-767.
2. Poignard P, Saphire EO, Parren PWHI and Burton DR. GP120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* 2001;19:253-274.
3. Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, Goth WC, Terwilliger E, Dayton A, Rosen C, Haseltine W and Sodroski J. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immune deficiency virus type1. *Science* 1987;237:1351-1355.

4. Neurath RA, Nathan S and Lee SE. B-cell epitope mapping of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins with long (19-to-36 residue) synthetic peptides. *J Gen Virol* 1990: 71:85-95.
5. Horal P, Svennerholm B, Jeansson S, Rymo L, Hall WW and Vahlne A. Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol* 1991: 65:2718-2723.
6. Laal S and Zolla-Pazner S. Epitopes of HIV-1 glycoproteins recognized by the human Immune System. *Chem Immunol* 1993. 56:91-111.
7. Broliden P, Von Gegerfelt A, Clapham P, Jonathan R, Fenyo E, Wahren B and Broliden K. Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992. 89:461-465.
8. Loomis L, Deal C, Kersey K, Burke D, Readfield R and Birx D. Humoral responses to linear epitopes on the HIV-1 envelope in seropositive volunteers after vaccine therapy with rg0160. *J Acquir Immune Def Syndr*. 1995. 10:13-26.
9. Norrby E, Putkoonen P, Bottiger B, Utter G and Biberfeld G. Comparison of linear antigenic sites in the envelope protein of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 and type 1. *AIDS Res and HUM Retroviruses*. 1991. Vol.7.3:279-285.
10. Fling JA, Fischer JR and Boswell RN. The relationship of serum IgA concentration to human immunodeficiency virus: a cross-sectional study of HIV seropositive individuals detected by screening in the United States Air Force. *J Allergy Clin Immunol*. 1988. 82:965-970.
11. Müller F, Frøland SS, Havtum J, Radl JJ and Brandtzaeg P. Both IgA subclasses are reduced in parotid saliva from patients with AIDS. *Clin Exp Immunol*. 1991.83:203-209.
12. Mestecky J, Moro I and Underdown BJ. Mucosal Immunoglobulins. In: *Mucosal Immunology* (Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, eds) 2nd ed, Academic Press, San Diego, California. 1999:133-152.
13. Gregory RL. The biological role and clinical implications of IgA. *Lab Med* 1994. 25:724-728.
14. Tomasi TB, Tan EM, Salomon A and Prendergast RA. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J Exp Med*. 1965. 121:101-124.
15. Challacombe SJ and Shirlaw PJ. Immunology of diseases of the oral cavity. In: *Handbook of Mucosal Immunology* (Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W,

McGhee JR and Bienenstock J, eds) Academic Lpress, San Diego, California. 1994:607-624.

16. Russell MW, Hedges SR, Wu HY, Hook EW 3rd, Mestecky J. Mucosal Immunity in the genital tract: prospects for vaccines against sexually transmitted diseases. *Am J Reprod Immunol*. 1999. 42(1):58-63.
17. Cartry O, Moja P, Quesnel A, Pozzeto B, Lucht FR and Genin C. Quantification of IgA and IgG and specificities of antibodies to viral proteins in parotid saliva at different stages of HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1997. 109:47-53.
18. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, Kariuki C, Ngugi EN, MacDonald KS, Ball TB, Clerici M and Plummer FA. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS*. 1999. 13:23-29.
19. Raux M, Finkielstejn L, Salmon-Céron D, Bouchez H, Excler JL, Dulioust E, Growin JM, Sicard D and Blondeau C. Comparison of the distribution of IgG and IgA antibodies in serum and various mucosal fluids of HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res and Hum Retroviruses* 199. Vol 15:15:1365-1376.
20. Lu XS, Delfraissy JF, Grangest-Keros L, Rannou MT and Pillot J. Rapid and constant detection of HIV antibody response in saliva of HIV-infected patients; selective distribution of anti-HIV activity in the IgG isotype. *Res Virol*. 1994:145:369-377.
21. Skott P, Lucht E, Julander I, Dillner J and Bjorling. Salivary sIgA response in HIV-1 infection. *JAIDS* 1999. 21:73-80.
22. Sweet SP, Rahman D and Challacombe SJ. Serum and saliva immunoglobulin A concentration show an inverse relationship in HIV infection and AIDS. *AIDS* 1995. 9:1288-1289.
23. Artenstein AW, VanCott TC, Sitz KV, Robb L, Wagner KF, Veit S, Garner R, Byron J, Burnett P and Birx D. Mucosal immune responses in four compartments of women infected with human immunodeficiency virus type 1: A comparison by site and correlation with clinical information. *J Infect Dis* 1997. 175:265-271.
24. Tomiyama T, Lake D, Masuho Y and Hers E. Recognition of Human Immunodeficiency virus glycoproteins by natural anti-carbohydrate antibodies in human serum. *Bioch and Biophy Res Comm*. 1991.1:279-285.
25. Matsuda S and Noda M. Detection of IgA binding sites on human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoproteins, gp120 and gp41. *Microbiol Immunol* 2000: 44:923-929.

26. Robinson WE, Goornny MK, Xu JY, Mitchell WM, Zolla-Pazner S. Two immunodominant domains of gp41 bind antibodies which enhance HIV-1 infection in vitro. *J Virol* 1991. 65:4169-4176.
27. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Claphan PR, Weiss RA and Axell R. Thee T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986. 47:333-348.
28. Warren R, Wolf H, Zajac R, Boswell R, Kanda P and Kennedy R. Patterns of antibody reactivity to selected human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp160 epitopes in infected individuals grouped according to CD4+ cell levels. *J Clin Immunol* 1991: Vol 11:1:13-21.