

03062

3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

FACTORES RELACIONADOS CON LA TRANSMISION MATERNO-INFANTIL DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA DE TIPO 1 (VIH-1).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

Q.F.B. MARIA FERNANDA MARTINEZ SALAZAR

MEXICO, D. F.

02/08

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos UNAM-SSA, bajo la asesoría de la Dra. Carmen Soler Claudín.

Agradezco a todos los integrantes de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos y en especial a Carmen por el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis.

A mi familia y amigos

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	14
III. MATERIALES Y METODOS	15
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
VI. CONCLUSIONES	43
VII. BIBLIOGRAFÍA	44

I. INTRODUCCION

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA/ SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (VIH/SIDA).

A finales de 1999 se reportó por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas en VIH/SIDA (ONUSIDA) que 33.4 millones de adultos y niños tenían el virus de inmunodeficiencia humana/ síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA), y de los cuales ya han muerto 13.9 millones^{1,2}. Se calcula que cerca de 16,500 nuevas infecciones con el VIH ocurren cada día. Quinn T.³ sugirió en 1996 que si no se encontraban estrategias de prevención efectivas en esos momentos, para el año 2000 habría más de 40 millones de hombres, mujeres, niños y niñas infectados con el VIH.

En México hasta el 1o. de diciembre de 1999 se han presentado 39,581 casos de SIDA⁴. La mayor parte de estos casos ocurrió en personas de 20 a 39 años de edad, de los cuales 75% correspondió a hombres, 14% de los casos a mujeres y 817 casos corresponden a niños y niñas menores de 15 años. De estos últimos el 59.4% se infectó por vía perinatal, 37.2% por transfusión sanguínea, 13.3% por productos sanguíneos y 3.4% por abuso sexual.

La proporción hombre/ mujer es diferente según los grupos de edad. En el grupo más afectado (25 a 39 años) esta proporción se encuentra entre seis y ocho hombres por cada mujer afectada, mientras que en el grupo de menores de 10 años la proporción es de 1:1 ó de 2:1^{5,6}

2 -PATRONES DE TRANSMISIÓN

La transmisión del VIH puede darse a través de tres vías: a) La sexual puede ser por contacto homosexual o heterosexual, este tipo de transmisión ocurre con una eficiencia de 0.01 a 1.0% y representa alrededor del 80% de todos los casos de infección por VIH en el mundo, b) La vía sanguínea puede ser por transfusión sanguínea y tiene una eficiencia de transmisión mayor a 90%. La transmisión por la vía sanguínea también abarca el transplante de órganos, inseminación artificial y transmisión por derivados sanguíneos. Sin

embargo, la eficiencia de transmisión por estas rutas no está bien definida. En global la vía sanguínea representa 5-10% del total de los casos mundial ⁷ y c) La vía perinatal o transmisión materno-infantil (TM-I) del VIH, la cual puede ocurrir *in útero*, durante el momento de parto o por la alimentación con leche materna. La eficiencia de la transmisión perinatal del virus es de 15 a 40% según la región geográfica de la que se trate. En países de Europa se reporta un rango de transmisión del VIH de la madre a su hijo de 15-20% ⁸; en EUA, antes de 1994 entre 17-25% ⁹, mientras que en países en vías de desarrollo la TM-I es más eficiente presentando un rango de 25 a 40%¹⁰. En el caso de México, no se dispone de datos confiables respecto al número de personas infectadas con el VIH y por lo tanto no se conoce el porcentaje de mujeres que transmiten el virus a sus hijos. Esta vía de transmisión representa un 3%-5% del total de casos a nivel mundial ¹¹.

La eficiencia de transmisión de cada una de estas vías esta influenciada por la cantidad de virus infeccioso, (virulencia e infectividad), por factores relacionados con el huésped (susceptibilidad y respuesta inmune) y por factores ambientales (geográficos, económicos, culturales, sociales y políticos)¹².

3.- TRANSMISIÓN MATERNO-INFANTIL DEL VIH.

La TM-I del VIH es un fenómeno complejo, diversos estudios publicados refieren la participación de múltiples factores en la madre que han sido relacionados con un mayor o menor riesgo de TM-I del VIH, lo que se ve reflejado en la gran variabilidad de eficiencia de la misma reportada mundialmente.

Los factores maternos que han sido relacionados con un mayor o menor riesgo de la transmisión son:

1.- Factores inmunes.-

La TM-I del virus está relacionada de una manera muy importante al estado del sistema inmune y a la respuesta inmunológica ante la infección de la madre. Varios reportes han demostrado que a menor número de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica mayor riesgo de transmisión, sin embargo, no está definido un valor celular límite que indique si habrá o no transmisión^{13, 14}

Un área que ha recibido mucha atención es el estudio de los anticuerpos neutralizantes del VIH presentes en la madre al momento del nacimiento, tema que ha sido abordado por numerosos investigadores y cuyos resultados son contradictorios, por ejemplo:

- Scarlatti y colaboradores^{27, 28}, correlacionan la transmisión del virus con niveles bajos o ausencia de anticuerpos neutralizantes maternos contra virus autólogos.

- Kenneth y colaboradores¹⁵ encontraron una mayor actividad neutralizante en los sueros de las mujeres no transmisoras contra virus prototipo Lai y utilizando la línea celular MT-2 como células blanco.

- Devash y colaboradores¹⁶ y Rubinstain y colaboradores¹⁷ encontraron que, la presencia de anticuerpos de alta afinidad y avidéz contra el dominio principal de neutralización de la región V3 de la cepa viral MN, en mujeres en etapa final del embarazo, están asociados con la protección de la infección en el niño.

Estos resultados nos sugieren que la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el VIH pueden estar relacionados con un menor riesgo de la TM-I de este virus. No obstante, los estudios realizados por Mabondzo y colaboradores²¹ y Goedert y colaboradores¹⁸ quienes estudiaron la presencia de anticuerpos neutralizantes contra virus autólogos y heterólogos empleando un sistema de células sanguíneas periféricas y macrófagos y no encontraron diferencias significativas entre madres transmisoras y no transmisoras del virus.

La interpretación de todos estos resultados se complica tanto por las diferencias metodológicas entre los distintos estudios, como por la gran variabilidad antigénica del virus que induce cambios de reactividad de los anticuerpos en el transcurso del tiempo.

También ha sido estudiada la reactividad de anticuerpos maternos contra los diferentes componentes virales. Kenneth y colaboradores ¹⁵ estudiaron la reactividad de los sueros de mujeres VIH-positivas contra distintos péptidos de la región carboxilo terminal de la glicoproteína transmembranal del VIH-1, la gp41 y encontraron mucho mayor reactividad en los sueros de las mujeres no transmisoras. Mann y colaboradores ¹⁹ encontraron que la presencia de anticuerpos de la subclase IgG2 contra la glicoproteína viral gp160, y los anticuerpos de tipo IgE contra la proteína viral p66 en sueros de mujeres embarazadas se correlaciona con la transmisión del VIH a los niños.

Otros estudios han abordado el tema de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), sin embargo, no se ha visto que ésta tenga un papel importante en la transmisión materno- infantil del VIH ²⁰. Mabondzo y colaboradores ²¹ no encontraron relación entre la capacidad de los anticuerpos para mediar la ADCC y la capacidad para inducir la protección en los niños.

Con respecto a la respuesta inmune celular, se ha visto que la función de los linfocitos T citotóxicos (CTL) ya sea durante la infección primaria o durante el periodo asintomático es eliminar células infectadas con el virus lo cual ocasiona una disminución de la replicación viral ²². Con tal antecedente, es posible pensar que la presencia de actividad citotóxica específica contra células infectadas con el VIH ya sea durante el periodo de embarazo o durante el parto pudiera estar relacionada con un bajo riesgo en la transmisión.

2.- Factores virales

La detección del número de copias de RNA viral presentes en el plasma de un individuo infectado con el VIH, nos da una medida para determinar los niveles plasmáticos de virus. La correlación entre los niveles plasmáticos de virus y el riesgo de transmisión al recién nacido ha sido extensamente estudiado.

Se ha encontrado que un incremento en los niveles de RNA viral plasmáticos en la madre están relacionados con un riesgo mayor de transmisión. Zöllner y colaboradores ²³

encontraron que en 4 mujeres con valores de más de 100,000 copias de RNA viral/ mL de plasma en el momento del parto, transmitieron el virus a sus hijos, mientras que mujeres que presentaban niveles de RNA viral por debajo de las 100,000 copias, 17 de 19 no transmitieron el virus a sus hijos.

Existen otros estudios como el de Thea y colaboradores ²⁴ en el cual también encuentran diferencias en los niveles de carga viral entre el grupo de mujeres transmisoras y el grupo de mujeres no transmisoras (16,000 copias de RNA vs 6600 copias de RNA respectivamente).

La detección de los niveles de RNA viral plasmáticos en la mujer embarazada resulta ser una herramienta importante para predecir el riesgo de infección del niño. Así pues, se ha correlacionado que niveles de RNA plasmáticos elevados en la madre están asociados con un mayor riesgo de transmisión del VIH al feto o recién nacidos. No obstante, se han detectado casos de infección perinatal aún en mujeres que tienen valores de RNA viral plasmáticos muy bajos o indetectables ^{25,26}

Los aislados virales pueden distinguirse de acuerdo a la capacidad replicativa y citopatogenicidad en células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) y en líneas celulares.

Scarlati y colaboradores ^{27, 28} clasificaron a los aislados virales de mujeres gestantes en a) bajos/lentos si eran capaces de replicarse en CSMP y en la línea celular Jurkat-tat y b) altos/rápidos si eran capaces de replicarse en al menos una línea celular adicional (Jurkat, CEM, U937 clona 2 o MT-2). Los resultados obtenidos por estos autores fueron que las madres que transmitieron el virus a sus hijos tenían aislados virales altos/rápidos, mientras que las mujeres que no transmitieron el virus a sus hijos tenían aislados virales bajos/lentos.

Los virus linfotrópicos son aquellos virus capaces de inducir sincicios en una línea celular T y se consideran como virus inductores de sincicios (IS), mientras que los virus macrotrópicos son aquellos virus que no son capaces de crecer en líneas celulares T y no forman sincicios (NIS) ²⁹.

Virus maternos con una cinética de replicación alta y propiedades citopáticas asociadas al fenotipo IS han sido considerados como un factor de riesgo para la transmisión ⁹. Sin embargo, se ha reportado que virus maternos NIS, también son capaces de transmitirse al

niño ³⁰. Esto podría explicarse considerando que la capacidad replicativa y no la capacidad IS sea la principal determinante en la TM-I del VIH.

En cuanto al genotipo viral materno se ha observado que una mutación específica en la región variable V3 del gen *env* del VIH obtenida directamente de DNA proviral en CSMP (Arg318 por serina, leucina o lisina) está presente principalmente en las mujeres no transmisoras (5 de 11 mujeres no transmisoras y 1 de 10 mujeres transmisoras)³¹.

3.- Factores clínicos/ obstétricos

Dentro de los factores clínicos/ obstétricos que pueden aumentar el riesgo de TM-I del VIH están:

- Infección primaria con el VIH o un estado avanzado de la enfermedad.- Durante estos periodos hay un aumento de los niveles de RNA plasmáticos y una disminución de linfocitos T CD4+ circulantes en sangre.
- Co-infecciones: la presencia de otros agentes infecciosos tales como el virus de la hepatitis C o el virus del Epstein-Barr ^{25, 11}.
- Eventualidades durante el parto: ruptura de membranas prolongada (mayor de 4h), rompimiento de placenta, corioamnionitis, parto natural y procedimientos invasivos ³². Estas eventualidades sólo pueden estar asociadas cuando la transmisión ocurre en el momento del parto y no cuando la transmisión haya ocurrido en útero o por alimentación con leche materna.

4.- Factores nutricionales

La deficiencia de vitamina A y de otros micronutrientes como el zinc y el folato han sido asociados con un mayor riesgo de TM-I del VIH-1³³.

Empleando resultados obtenidos con el estudio de otros agentes infecciosos como toxoplasma , rubéola o parvovirus, se ha desarrollado un modelo hipotético de la transmisión materno-infantil del VIH ^{34, 35}.

MODELO DE TRANSMISION VERTICAL

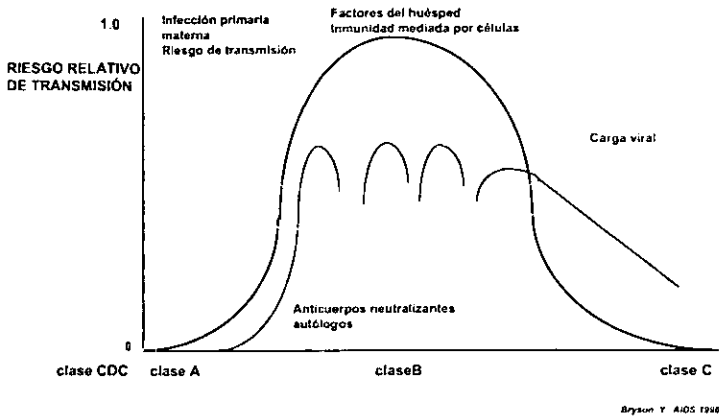


Figura. 1. Modelo hipotético de transmisión vertical.

La figura 1 ilustra un modelo hipotético de la transmisión perinatal del VIH-1 desarrollado por Bryson ³⁵ donde se indica que los cambios en el riesgo de transmisión están relacionados con la duración de la infección en la madre y con los factores virológicos e inmunológicos de ésta.

El estado clínico ha sido clasificado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), en 3 categorías:

- La clase A corresponde a la infección primaria con VIH.
- La clase B corresponde al periodo asintomático de infección por VIH.
- La clase C corresponde a la progresión de la enfermedad hasta el desarrollo del SIDA.

El eje X se refiere al estado clínico y está relacionado con el tiempo transcurrido de infección. El riesgo relativo de transmisión se grafica en el eje Y, puede considerarse mayor cuando la carga viral esta en niveles más altos y asociada con una baja inmunidad mediada por células o anticuerpos neutralizantes, lo cual es consistente con los datos de que mujeres con una infección primaria o un estado avanzado de la enfermedad tienen un mayor riesgo de transmisión. La mayoría de las mujeres infectadas, si se reproducen, lo harán antes de estar enfermas (clase C). Este modelo propone que la capacidad para

producir anticuerpos neutralizantes contra las partículas virales es un proceso dinámico y esta relacionado con la carga viral dependiendo del estado del sistema inmune de la madre. Se ha reportado que los anticuerpos neutralizantes maternos son capaces de neutralizar cepas virales previas, no así a las nuevas cepas virales que se están produciendo continuamente³⁵.

- INMUNIDAD DEL FETO/ NIÑO

Se sabe que la TM-I del VIH puede ocurrir en útero, vía infección transplacentaria hacia el feto, durante el momento del parto por contacto con sangre y/o secreciones vaginales y por alimentación con leche materna.

La transmisión pudo haber ocurrido en útero si el VIH es detectado por PCR o cocultivo dentro de las primeras 48 horas de vida del recién nacido.

La transmisión pudo haber ocurrido durante el parto si el VIH es detectado por un PCR o cocultivo positivo después de los 7 días del nacimiento, siempre y cuando el niño no haya recibido alimentación con leche materna.

Estos criterios están basados en el hecho de que, el intervalo de tiempo requerido entre el momento de la infección y la capacidad para detectarla, está dado por el número de ciclos de replicación viral e infección de nuevas células que se necesitan para alcanzar niveles suficientes de virus integrado en células circulantes para ser detectable por PCR o cocultivo.

Se propone que en el caso de la transmisión in útero este lapso de tiempo de infección-replicación-detección ya ocurrió para el momento del nacimiento, sin embargo factores intrínsecos del hospedero o del virus tales como cantidad del inóculo, características genotípicas de la cepa viral infectante, genética del hospedero, respuesta inmune, susceptibilidad de las células blanco o el uso de antiretrovirales pueden influir en este periodo de tiempo.

Existen evidencias de que la transmisión puede ocurrir en útero, ya que se ha logrado identificar el virus en tejido fetal desde las 8-12 semanas de gestación incluyendo nódulos linfáticos, cerebro y timo ³⁶. El mecanismo exacto por el cual ocurre la infección en el feto se desconoce.

Se ha reportado que durante las primeras 18-20 semanas de gestación el feto es capaz de responder a agentes infecciosos con factores inmunes clasificables en tres niveles.(Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de inmunidad en el feto

1er NIVEL (INESPECIFICO)	2o. NIVEL (CON POCA ESPECIFICIDAD HACIA ANTÍGENOS)	3er NIVEL (CON ALTA ESPECIFICIDAD HACIA ANTÍGENOS)
Leucocitos polimorfonucleares	Células CD5 ⁺ B1	Células CD5 ⁺ B1 "convencionales"
Monocitos/macrófagos	Células CD5 ⁺ B1	Células T $\alpha\beta$
Células asesinas	Células T $\gamma\delta$ (CD4 ⁺ y CD8 ⁺)	Algunas citocinas
Eosinófilos	Monocinas y linfocinas	IgM polimérica
Basófilos/células cebadas	Complemento (vía natural)	sigA monomérica y polimérica
Interferón α y β	IgM monomérica y polimérica	IgG
Monocinas	IgA polimérica (secretoria)	IgE
Complemento (vía alternativa)		
Proteína C reactiva		
Fibronectina		

Las células CD5⁺ B1 "convencionales" y las células T $\gamma\delta$ están presentes en el feto normal, generalmente en una forma no activada.

El primer nivel comprende los factores inespecíficos de resistencia del huésped tales como las células fagocíticas.

El segundo nivel comprende células B1 CD5⁺, las cuales representan la mayoría de las células en el feto y producen los autoanticuerpos, factor reumatoide y primordialmente anticuerpos de tipo IgM. La regulación de la respuesta de estas células contra antígenos propios o contra los anticuerpos maternos de tipo IgG transmitidos transplacentariamente probablemente sea mediado por acciones supresoras de las células T gamma-delta y células T "nativas" no activadas presentes en el feto.

Cuando hay una infección transplacentaria las células de cualquiera de los tres niveles de inmunidad son activadas y producen distintas citocinas e inmunoglobulinas. Así pues, una infección sifilítica adquirida en el segundo trimestre podría inducir una respuesta fagocítica

inespecífica (nivel 1); incremento en los autoanticuerpos, inmunoglobulinas de tipo IgM contra la IgG materna (nivel 2) y anticuerpos específicos anti-treponema (nivel 3)³².

Actualmente no hay ningún estudio publicado con respecto a los niveles de inmunidad con los cuales el feto es capaz de responder al VIH. Se ha reportado que algunos niños nacidos de mujeres infectadas poseen respuesta celular específica contra el virus, esto se ha determinado tanto por ensayos de linfoproliferación ³⁷ como con ensayos de citotoxicidad.

En el caso de los niños infectados se ha demostrado que son capaces de montar una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) VIH-específicos. La detección de esta respuesta en células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) de cordón umbilical y en CSMP de sangre periférica tomada a las tres semanas de vida han sugerido que estos niños tienen la capacidad de desarrollar una respuesta específica contra el virus durante la vida fetal, sin embargo la detección de la respuesta de CTL VIH-específica varía mucho entre estos niños, así también varía la edad durante la cual es posible detectar esta respuesta, y la especificidad a los distintos péptidos del VIH^{38,39}

En el caso de los niños nacidos de madres infectadas en los que no hubo transmisión también se ha demostrado que poseen una respuesta linfoproliferativa y/o citotóxica específica contra el virus. Se ha postulado que el desarrollo de esta respuesta les confirió protección ante la infección. Sin embargo, existe aún mucha controversia al respecto, ya que algunos investigadores como Luzuriaga y colaboradores ³⁹ y Bryson y colaboradores, ³⁵ mantienen que no han encontrado este tipo de respuesta en los niños o niñas que no se infectaron, mientras que Rollides y colaboradores ⁴³ y Borkowsky y colaboradores ³⁷ demuestran lo contrario.

Estas discrepancias encontradas pueden deberse a las metodologías utilizadas por estos grupos, ya que sus artículos reportan variaciones en las técnicas empleadas. Para lograr obtener resultados comparativos será necesario estandarizar dichas metodologías.

4.- ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA INFECCIÓN PERINATAL POR VIH.

La mejor forma de prevenir la transmisión materno-infantil del VIH es a través de acciones encaminadas a una detección temprana del VIH en las mujeres, de tal suerte que tengan que decidir si quieren o no embarazarse en el caso de ser seropositivas. En la mayoría de los países, la prueba para la detección de anticuerpos anti-VIH solo se realiza en aquellas mujeres que lo solicitan o en las que se sospecha que hay infección.

Uno de los grandes avances en los últimos años han sido los resultados del estudio multicéntrico ACTG 076 (AIDS Clinical Trials Group Protocol 076) llevado a cabo en Estados Unidos y Europa. Con este estudio se demostró que el administrar un antiretroviral llamado zidovudina (ZDV) a mujeres embarazadas infectadas por el VIH a partir de la semana 14 del embarazo hasta el momento del parto y al recién nacido durante las primeras seis semanas de vida, disminuía el riesgo de transmisión hasta 8% ⁴¹.

El mecanismo exacto por el cual la ZDV reduce la transmisión se desconoce aunque se sabe que se altera la infectividad viral, se previene el establecimiento de la infección fetal después de la posible exposición al VIH, y ocasiona la disminución de la carga viral materna.

Existen todavía algunas interrogantes a resolver en relación a los resultados esperados del protocolo ACTG 076, como ¿cuál será la disminución del riesgo de la TM-I en mujeres que no cuentan con las características de las que ingresaron al protocolo? (cuentas de linfocitos T CD4+ mayores de 200 células/ μ L de sangre, asintomáticas e inicio de tratamiento desde etapas tempranas del embarazo, sin tratamiento previo con ZDV). En países en vías de desarrollo es frecuente detectar a las mujeres embarazadas infectadas en el momento del parto ya que no acuden a control prenatal, o cuando ya se encuentran sintomáticas y con cuentas de linfocitos T CD4+ menores de 200 células/ μ L.

Asimismo, se han planteado inquietudes sobre los efectos secundarios de la ZDV a largo plazo, incluyendo efectos teratogénicos y carcinogénicos en los hijos de mujeres tratadas con este antiretroviral durante su embarazo. Los estudios realizados hasta la fecha con seguimiento a largo plazo de los hijos de madres tratadas con ZDV no han demostrado estos efectos adversos y han mostrado la seguridad de su uso en mujeres embarazadas. No obstante, no se ha considerado los efectos que puedan tener la aparición de cepas

resistentes a la ZDV, ya que podría dificultar el tratamiento terapéutico posterior de la mujer y el niño.

Toda mujer deberá ser informada de los beneficios, riesgos y limitaciones que tiene esta estrategia y la mujer deberá tomar la decisión final de aceptar o no el tratamiento con ZDV, pero para poder contar con esta opción deberá asegurarse por el sistema de salud el acceso de todas las mujeres a este tratamiento.

Actualmente se están evaluando la eficacia, tolerancia y seguridad de otros antiretrovirales tales como: 3TC, Nepiravina, combinaciones de 3TC y ZDV, o combinaciones triples de ZDV, Indinavir y ddl.

En un informe presentado por Lorenzi y colaboradores ⁴² en la XII Conferencia Internacional de SIDA centrado en los resultados de embarazos en tres cohortes suizas se sugirió posibles consecuencias adversas derivadas del tratamiento de combinación (dos análogos de nucleósidos más uno o dos inhibidores de proteasa) durante el embarazo. Aunque no se observaron reacciones adversas en las madres, sí se observaron 2 casos de niños que nacieron prematuramente y dos casos de hemorragia cerebral en niños expuestos al indinavir. Como conclusión a este trabajo, no se aconsejó el empleo de regímenes de combinación basados en inhibidores de proteasa mientras no se tengan estudios más amplios respecto a su eficacia y seguridad.

La cesárea programada esta asociada a una menor incidencia de transmisión que las cesáreas de emergencia o partos vaginales independientemente del empleo del tratamiento antiretroviral. En un estudio alemán donde se analizaron 255 nacimientos encontraron que la cesárea programada sin ZDV produjo un índice de transmisión del 10.8%, comparado con el 7% en los partos vaginales con ZDV y con el 2.5% en partos por cesárea con ZDV⁴³.

En relación a la prevención de la transmisión materno-infantil (PTM-I) del VIH a través de la lactancia materna, esta se ha visto que aumenta el riesgo de transmisión del virus entre 15-20%. Sin embargo, varios estudios realizados han demostrado que la lactancia materna ofrece grandes ventajas a nivel nutricional, inmunológico y psicosocial, ya que disminuye la incidencia de enfermedades diarreicas, respiratorias u otras infecciones y ayudan al espaciamiento de los embarazos, por lo que de manera general se deberá seguir recomendando su uso ⁴⁴.

Las instituciones del sector salud deberán tratar de asegurar el abasto de alimentación artificial para todos aquellos hijos de madres infectadas a fin de disminuir el riesgo de transmisión.

En nuestro país no se cuenta con un sistema de detección temprana en mujeres embarazadas, ya que el diagnóstico de VIH no se ofrece como prueba dentro de los exámenes prenatales que se hacen de rutina.

Una de las finalidades de este trabajo es determinar la factibilidad de realizar un proyecto de Prevención de la Transmisión Materno-Infantil del VIH-1 (PTM-I) por detección temprana y tratamiento con ZDV y demostrar la eficacia del tratamiento con AZT durante el embarazo en la reducción del riesgo de TM-I del VIH-1.

Para llevar a cabo este proyecto fue necesario establecer una colaboración con el Consejo Nacional para la Prevención del SIDA (CONASIDA), con el laboratorio farmacéutico Glaxo-Wellcome y con el Programa Universitario de Investigación en Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México (PUIS/UNAM), además de la participación del personal de salud de la Jurisdicción Sanitaria de Cd. Nezahuálcóyotl, Estado de México.

Se decidió trabajar este protocolo en Cd. Nezahuálcóyotl ya que cuenta con 1,260,000 habitantes y 30,000 embarazos anuales y es una de las zonas con mayor número de casos de SIDA reportados debido a que es el lugar de residencia de gran parte de los donadores de sangre remunerados que existían en nuestro país a principios de la década de los años 80's.

Como se mencionó anteriormente, existe aún mucha controversia en cuanto a que si los niños no infectados nacidos de mujeres VIH infectadas desarrollan una respuesta inmune celular que les podría estar confiriendo protección ante la infección. Es por esto que se decidió trabajar con una población de niños infectados y no infectados nacidos de mujeres VIH-infectadas para determinar la presencia o ausencia de respuesta inmune celular mediante ensayos de linfoproliferación VIH-específicos.

Entender los mecanismos exactos por los cuales un gran porcentaje de estos niños no se infectan es de gran importancia, tanto para prevenir la TM-I del VIH-1 en todos los niños como para el posible desarrollo de una vacuna que sea efectiva para toda la población.

II - OBJETIVOS

Generales

- Estudiar algunos aspectos inmunológicos y virológicos relacionados en la transmisión materno-infantil del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.

Específicos

- Determinar la relación entre el estado de infección de los niños nacidos de mujeres VIH-1 infectadas y los valores de RNA viral plasmático y los linfocitos T CD4+ circulantes en sangre.
- Determinar prevalencia de infección por VIH-1 en mujeres embarazadas de Cd. Nezahualcóyotl, Estado de México.
- Determinar si existe una relación entre la respuesta inmune celular VIH-específica con la prevención de la transmisión del VIH en niños nacidos de mujeres infectadas.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

CAPTACIÓN DE MUJERES EMBARAZADAS VIH-POSITIVAS.

La detección de mujeres embarazadas VIH-infectadas se llevó a cabo mediante el proyecto de "Prevención de la Transmisión Materno-Infantil del VIH por detección Temprana y Tratamiento con AZT" en colaboración UIRH-CONASIDA-Glaxo Wellcome-PUIS/UNAM y el personal de salud de la jurisdicción sanitaria de Cd. Nezahualcoyotl. El programa se realizó de diciembre de 1996 a agosto de 1998. Fue llevado a cabo en 2 centros hospitalarios (Hospital Gustavo Baz Prada y Hospital la Perla) y 21 Centros de Salud de Ciudad Nezahualcoyotl, Estado de México.

- La capacitación y asesoramiento del personal de salud involucrado en la atención a mujeres embarazadas se llevó a cabo mediante talleres de entrenamiento.
- La captación de mujeres embarazadas se realizó mediante campañas continuas de difusión del proyecto en los servicios ginecológicos y de atención prenatal de dichos centros, a través de carteles, folletos y sensibilización por transmisión de un video realizado con este fin (Una esperanza de vida).
- Se aplicó una encuesta para conocer factores de riesgo, condiciones sociodemográficas y las posibles causas de la aceptación o no de la prueba de diagnóstico.
- A todas las mujeres se les proporcionó información antes de realizarse la prueba (consejería preprueba) y se obtuvo consentimiento informado en aquellas que aceptaron participar en el programa.
- La detección de anticuerpos anti-VIH en estas mujeres se realizó mediante estuches comerciales de ELISA. Las muestras que resultaron reactivas repetidamente fueron confirmadas por Western Blot.
- Los resultados se entregaron personalmente en sobre cerrado con consejería post-prueba. En la figura 2 se muestra un diagrama de flujo del proceso.

FASE PREVIA DE ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL DE LAS INSTITUCIONES DE SALUD INVOLUCRADAS.

**EN CENTROS DE SALUD Y HOSPITALES
INFORMACION:
VIDEOS
FOLLETOS
CARTELES**

CAPTACION DE EMBARAZADAS

NO QUIERE PARTICIPAR

**MEDICO/ENFERMERA/TRABAJADORA SOCIAL
INFORMA Y PROPONE RESPONDER ENCUESTA**

SI QUIERE PARTICIPAR

CONSEJERIA PRE-PRUEBA

**ENTREGA DE RESULTADOS/
CONSEJERIA POST-PRUEBA**

**CONSENTIMIENTO
FIRMADO**

**TOMA DE
MUESTRA**

POSITIVO

NEGATIVO

**MEDICO TRATANTE LE EXPLICA
PROTOCOLO DE AZT Y LE PROPONE SU INGRESO**

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de captación de mujeres embarazadas

A las 7 mujeres que resultaron positivas (Grupo A) se les canalizó a cualquiera de los dos centros hospitalarios involucrados, donde se les propuso la entrada al protocolo de tratamiento con AZT, todas las mujeres detectadas que aceptaron ingresar firmaron una hoja de consentimiento. A las mujeres se les tomó una muestra de sangre (basal) para determinar los niveles de células CD4 y carga viral y posteriormente cada 3-4 meses.

A los 7 niños nacidos de éstas mujeres (Grupo A.1) se les realizaron los siguientes ensayos para diagnosticar la posible infección por VIH: detección de anticuerpos anti-VIH de tipo IgA, detección de anticuerpos de tipo IgG, detección de antígeno p24, aislamiento viral por co-cultivo, PCR y cuantificación de moléculas de RNA viral en plasma (carga viral).

El diagnóstico de VIH- 1 en niños se realiza mediante un algoritmo de pruebas que detectan la presencia del virus (aislamiento viral), proteínas virales (antígenos virales en plasma), PCR (genoma proviral) y/o anticuerpos anti-VIH de tipo IgA. La detección de anticuerpos anti-VIH de tipo IgG no resulta una herramienta útil, ya que los anticuerpos de tipo IgG atraviesan placenta y van a estar presentes en el niño hasta los 18-24 meses de edad. La pérdida de estos anticuerpos en los niños se le conoce como serorreversión. La presencia de estos anticuerpos por arriba de los 18-24 meses de edad indican infección por VIH.

Por otro lado se conformó otro grupo de 24 niños nacidos de mujeres VIH- infectadas (Grupo B) con edades que van desde recién nacidos hasta los 29 meses, con el fin de determinar la respuesta linfoproliferativa VIH-específica.

Las muestras de estos niños fueron enviadas a la UIRH de diferentes hospitales de México para su diagnóstico, el cual se realizó empleando las mismas metodologías que en los niños del grupo A.1 sin la determinación de carga viral.

Se clasificaron como infectados aquellos niños que tuvieran aislamiento viral, antígeno p24 detectable en plasma, PCR positivo y/o anticuerpos anti-VIH de tipo IgA en plasma, o anticuerpos anti-VIH de tipo IgG después de los 24 meses de edad. La carga viral no se considera metodología de diagnóstico.

Los grupos que conforman el estudio se muestran en la figura 3.

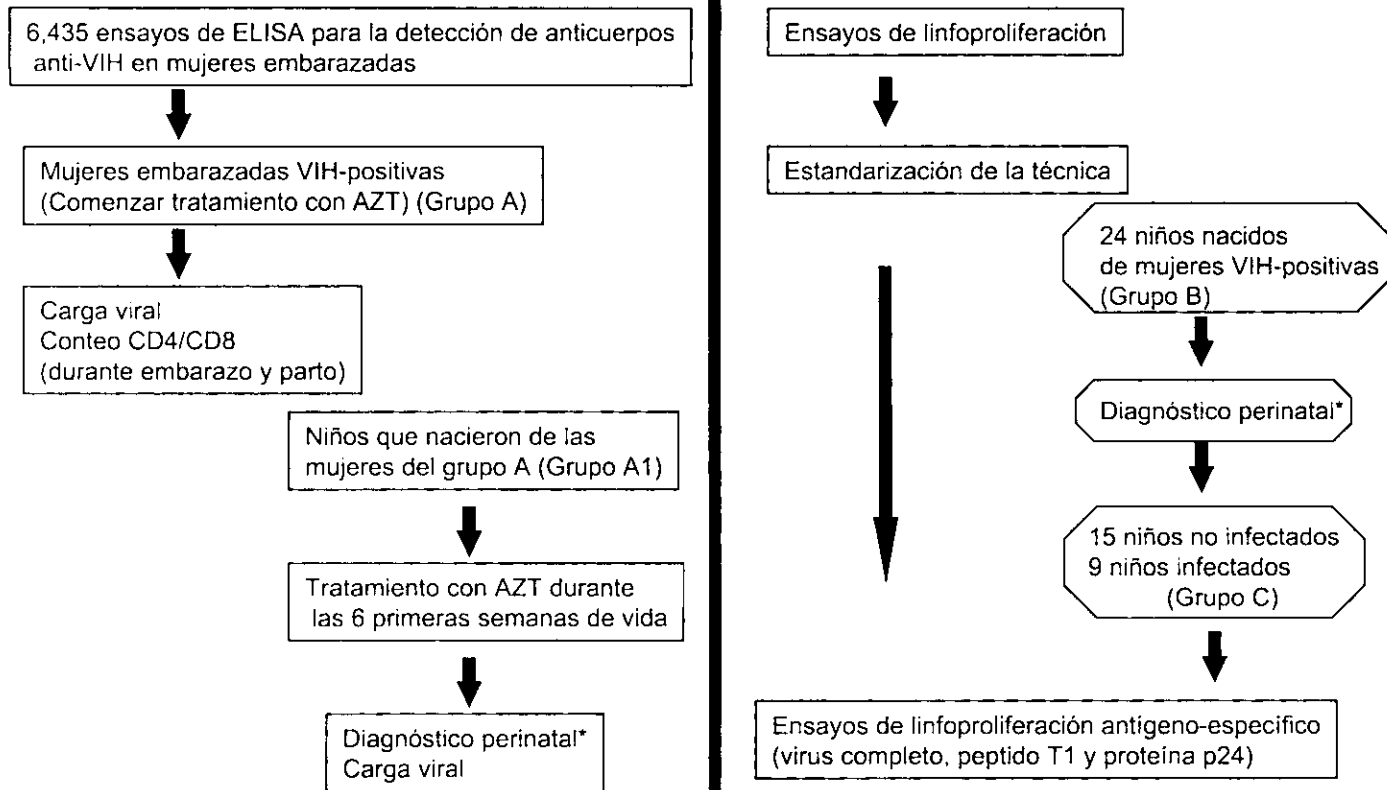


Figura 3. Obtención y procesamiento de los 3 grupos de muestras.

* Pruebas de laboratorio para el diagnóstico perinatal: ELISA IgG, ELISA IgA, Antígeno p24 en plasma, aislamiento viral por cocultivo, extracción de DNA para PCR.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre se colectaron con EDTA, se separó una alícuota para citometría de flujo (sólo a las muestras del grupo A) y el resto fue sometido a un gradiente de Ficoll centrifugando a 2,000 rpm, 20°C durante 30 minutos. El plasma obtenido se alícuotó y se congeló a -70°C para su uso posterior. Las células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) se lavaron con PBS estéril, se contaron y se distribuyeron en alícuotas para aislamiento viral, extracción de DNA y los ensayos de linfoproliferación (solo muestras del grupo B). El diagrama de flujo del procesamiento de las muestras pediátricas se muestra en la figura 4.

Las pruebas realizadas con el plasma fueron las siguientes:

- DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VIH. La detección de anticuerpos IgG anti-VIH se realizó mediante una ELISA empleando los estuches comerciales de Ortho Diagnostic y Genelavia Mix de Sanofi, Pasteur de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Como prueba suplementaria se empleó un Western Blot tal y como se describe en el Manual de Técnicas de VIH ⁴⁵

- DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VIH DE TIPO IgA. Los anticuerpos anti-VIH de tipo IgA se evaluaron mediante una ELISA de acuerdo al método desarrollado por Rossi ME⁵⁸.

- DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO p24. La determinación del antígeno p24 se realizó mediante ELISA comercial "HIVAG-1 Monoclonal" de la marca Abbott de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

- DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL.

Se determinó mediante el ensayo comercial de Hybrid Capture de Digene Corporation de acuerdo a las instrucciones del fabricante y utilizando una alícuota de plasma conservada a -70°C.

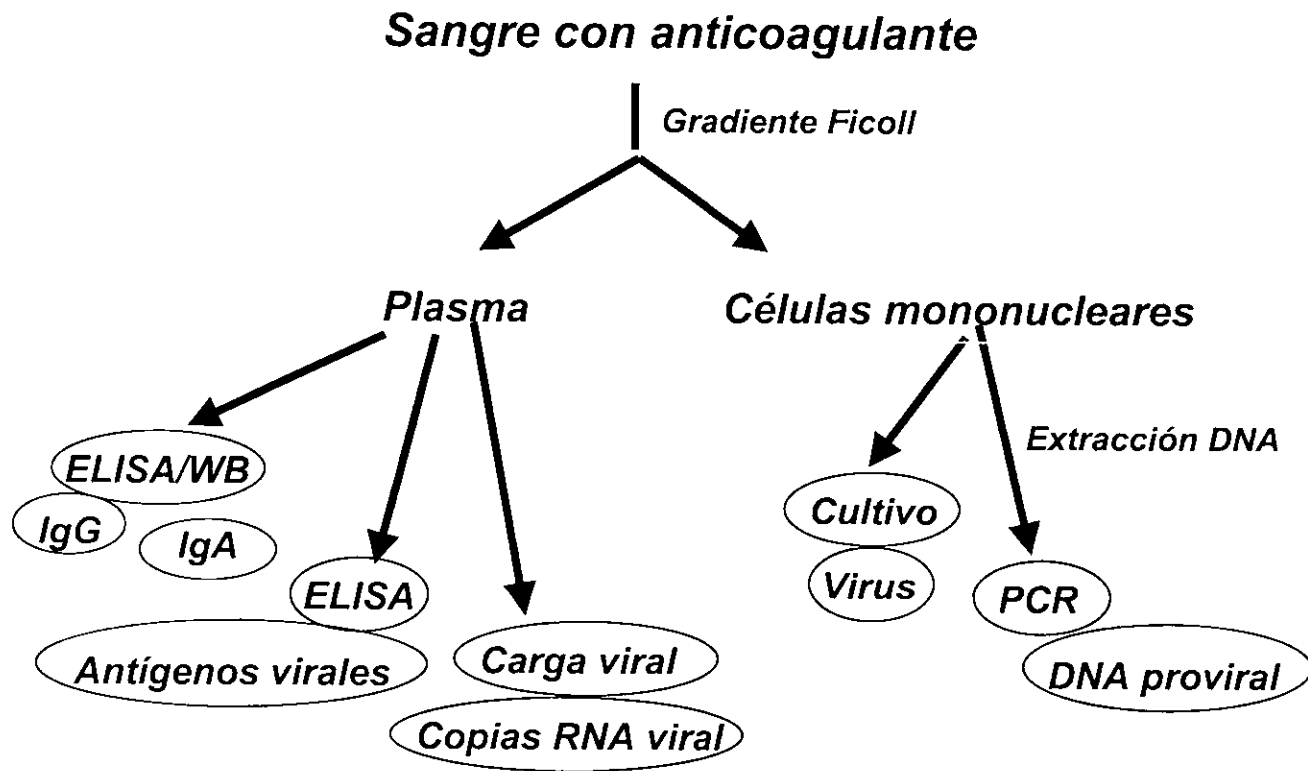


Figura 4. Procesamiento de las muestras pediátricas

Pruebas realizadas con las células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP)

- COCULTIVO. Se realizó de acuerdo a la técnica descrita en el Manual de Técnicas de VIH ⁴⁵

- EXTRACCIÓN DE DNA -PCR- Se realizó de acuerdo a la técnica descrita en el Manual de Técnicas de VIH ⁴⁵

- ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACIÓN. Se realizó como a continuación se describe:

La respuesta celular fue determinada mediante ensayos de linfoproliferación celular por incorporación de timidina tritiada marca Amersham para lo cual fue necesario montar y estandarizar esta técnica en el laboratorio.

Estandarización de la técnica de linfoproliferación celular

Mediante un gradiente de Ficoll, se obtuvieron las células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) de varios donadores sanos VIH-negativos. Se prepararon tres concentraciones celulares de 1×10^6 , 2×10^6 y 3×10^5 células en un mL de medio RPMI con 10%-Suero Fetal Bovino (SFB).

El resto de las células se congelaron en nitrógeno líquido para utilizarlas posteriormente como controles negativos de linfoproliferación antígeno específico.

En placas de 96 pozos de fondo plano se colocaron por triplicado $100 \mu\text{l}$ de cada una de las tres concentraciones celulares, para obtener 100, 200, y 300 mil células/pozo. Como control basal de proliferación celular, a las CSMP se les adicionó $100 \mu\text{l}$ de RPMI-10% SFB y como control máximo de proliferación celular $100 \mu\text{l}$ de medio con PHA (concentración final $5 \mu\text{g/mL}$), esto se hizo en tres placas y se dejó incubando por 3, 5 y 7 días respectivamente a 37°C y 5% de CO_2 . Veinticuatro horas antes de cosechar las CSMP, se adicionaron $0.5 \mu\text{Ci}$ de ^3H timidina a cada pozo. Posteriormente se colectó el DNA celular utilizando un cosechador semiautomático y se midió la radioactividad en el aparato β -plate TM1205 marca Wallac.

El índice de estimulación celular fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$IE = \Delta \text{cpm PHA} / \Delta \text{cpm control} \times 100$$

donde :

IE= Índice de estimulación celular

Δ cpm PHA =Promedio de los triplicados de las cuentas por minuto obtenidas al estimular las células con PHA.

Δ cpm control= Promedio de los triplicados de las cpm obtenidas en las células sin estimular

Ensayo de linfoproliferación antígeno-específico

Se utilizaron los siguiente antígenos específicos:

a) Virus completo:

Se centrifugaron 500 mL de un cultivo de la línea celular Molt permanentemente infectada con el virus prototipo IIIb a 1,200 rpm durante 10 minutos en tubos cónicos de 50mL, el sobrenadante obtenido se pasó por una unidad de filtración desechable de 0.45 μ m. El sobrenadante filtrado se distribuyó en tubos y se ultracentrifugó a 25,000 rpm durante 2 horas a 4°C sobre colchón de sacarosa 30%, el sobrenadante se desechó y la pastilla viral se resuspendió en 50 μ l de buffer TNE, se juntaron las suspensiones virales de todos los tubos para obtener un volumen de 500 μ l en total. El virus concentrado se purificó utilizando una columna de 5mL de sepharosa 4B a temperatura ambiente y utilizando TNE para eluir. Primero se añadieron aproximadamente 1-2mL de la solución de TNE, posteriormente se adicionó la suspensión viral, la elución del virus fue visible ya que comienzan a salir gotas lechosas, la recolección se hace hasta que desaparecen estas gotas. El virus eluido se concentró ultracentrifugando 15 minutos a 25,000rpm a 4°C, el sobrenadante se desechó y el virus purificado concentrado se resuspendió en PBS y se inactivó por calor 1h a 60° C y por luz UV 10 minutos. Se determinó la cantidad de proteína viral espectrofotométricamente y se hicieron diluciones de 10 μ g/mL, 5 μ g/mL y 1 μ g/mL.

b) Proteína recombinante p24 (Donado por NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). Esta proteína es derivada del gen gag del VIH-1 de la cepa SF-2. Esta proteína fue producida en levadura y comprende la región de aminoácidos 139-369, tiene una pureza mayor a 90% y su peso molecular es de 24,000. Se prepararon tres concentraciones distintas de: 10 μ g/mL, 5 μ g/mL y 1 μ g/mL con medio RPMI- 10% de SFB.

c) Péptido sintético T1: Este péptido fue donado por la Dra. Leonor Huerta del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y corresponde a los residuos de aminoácidos 426-444 (KQIINMWQEVGKAMYAPA) de la proteína gp120 de la cepa viral IIIb, con una pureza de 80%, se partió de una solución de 1mg/mL de PBS y se prepararon tres concentraciones distintas de: 10 μ g/mL, 5 μ g/mL y 1 μ g/mL con medio RPMI- 10% de SFB.

Se utilizó 100 μ l fitohemaglutinina (PHA) a una concentración final de 5 μ g/mL como control máximo de proliferación y RPMI 10%-SFB como control basal de proliferación celular.

- Se descongelaron las CSMP de los niños del grupo B, el cual consta de 9 muestras de niños diagnosticados como infectados a los cuales se les asignó las siguientes claves: P330, P362, P331, P338, P285, P237, P264, P280 y P268 y de 15 muestras de niños diagnosticados como no infectados, los cuales se les asignaron las siguientes claves: P293, P294, P278, P279, P360, P260, P246, P361, P335, P245, P213, P263, P350f, P262 y P271.

Las CSMP se lavaron y se contaron, y en placas de 96 pozos de fondo plano se colocaron por triplicado 100 μ l de la suspensión celular de 1x10⁶ células/mL de RPMI-10% de SFB, posteriormente, se agregó a cada uno de los pozos los antígenos utilizados (virus, proteína p24 y péptido T1) en las tres concentraciones evaluadas, (10 μ g/mL, 5 μ g/mL y 1 μ g/mL). En los casos en que el número de células no era suficiente se realizó el ensayo sólo con uno o dos de los antígenos específicos en sus tres concentraciones.

La respuesta linfoproliferativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Respuesta linfoproliferativa} = \frac{\text{IE PHA}}{\text{IE Ag viral}} \times 100$$

donde:

IE PHA= Índice de estimulación celular obtenido con PHA

IE Ag viral= Índice de estimulación celular obtenido con el péptido T1, proteína p24 o virus completo.

IV. RESULTADOS

Con el Programa de Prevención de la Transmisión Materno-Infantil del VIH por Detección Temprana y Tratamiento con AZT, se analizaron 6,435 muestras de plasma de mujeres embarazadas que acudieron a los Centros de Salud para control prenatal.

Se detectaron 38 muestras presuntamente positivas y 6,397 negativas en el ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos anti-VIH, 25 de las muestras presuntamente positivas resultaron negativas en el ensayo confirmatorio de Western Blot y 10 positivas al mismo, otras 3 muestras fueron indeterminadas. La distribución por muestreo en los 19 Centros de Salud y los 2 Hospitales participantes y los lugares donde se detectaron mujeres positivas, falsas positivas e indeterminadas se muestran en la tabla 2. Con respecto al total de muestras analizadas la seroprevalencia a VIH encontrada en este grupo de mujeres fue de 0.15% infectadas, 0.388% muestras falsas positivas y 0.046% indeterminadas. Los datos de seroprevalencia de esta Jurisdicción son mayores que los reportados en encuestas centinela realizadas previamente por CONASIDA en México (0.001-0.04%). Este aumento de seroprevalencia en la zona de Cd. Nezahualcóyotl puede deberse a que en esta zona ocurrieron un gran número de infecciones por VIH debido a que en la década de los 80's una gran proporción de donadores sanguíneos remunerados se infectaron con el VIH-1.

De las 10 mujeres positivas detectadas solo 6 fueron incluidas en el Protocolo de Tratamiento con AZT, además se incluyó una mujer más que no radica en Cd. Nezahualcóyotl. De las otras 4 mujeres también diagnosticadas como seropositivas a VIH, una murió de SIDA y las otras tres resultaron no estar embarazadas.

Tabla 2. Resultados del muestreo realizado en los Centros de Salud y Hospitales Generales de la jurisdicción sanitaria de Cd. Nezahualcóyotl

Institución	No. de muestras	% del total	Falsas Positivas	Indeterminadas	Positivas
Hospital General Dr. Gustavo Baz Prada	31	0.48	-	-	2
Hospital General La Perla	613	9.5	1	-	1
C.S. Vergelito	1,928	29.9	7	1	1
C.S. Los Reyes	884	13.7	3	-	-
C.S. Pirules	772	12.0	2	-	1
C.S. Aurora	753	11.7	9	1	1
C.S. Maravillas	576	9.0	2	-	3
C.S. J. de Guadalupe	197	3.0	-	-	-
C.S. Benito Juárez	182	2.8	-	-	-
C.S. Metropolitana	112	1.7	-	-	-
C.S. Emiliano Zapata	90	1.4	-	-	-
C.S. Manantiales	74	1.1	-	-	-
C.S. Edo. de México	60	0.9	-	-	1
C.S. El Sol	54	0.8	-	-	-
C.S. Loma Bonita	35	0.5	1	-	-
C.S. Floresta	27	0.4	-	-	-
C.S. Virgencitas	19	0.3	-	1	-
C.S. Nezahualcóyotl	15	0.2	-	-	-
C.S. Impulsora	10	0.15	-	-	-
C.S. Esperanza	2	0.03	-	-	-
C.S. Magdalena	1	0.01	-	-	-
TOTAL	6435		25	3	10

RESULTADOS DEL TRATAMIENTO CON AZT EN LAS MUJERES EMBARAZADAS

A todas las mujeres se les tomó una muestra de sangre antes del inicio del tratamiento (muestra basal) y en cinco casos fue posible tomar al menos una muestra más (mujeres M1, M2, M3, M4 y M6). En el caso de la muestra M5 sólo se tienen los valores de carga viral antes de iniciar el tratamiento con AZT y en el caso de la mujer M7, la cual dió a luz inesperadamente y casi al mismo tiempo en el que fue detectada, no fue posible darle tratamiento ni durante su embarazo ni durante el parto.

El AZT fué administrado durante el embarazo, parto y posteriormente a los bebés durante las 6 primeras semanas de vida. Posterior al parto las mujeres dejaron de recibir tratamiento por parte de este protocolo y fueron canalizadas para atención médica a un Hospital del Sector Salud. Los bebés fueron canalizados al Hospital Infantil de México o a la Unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México- UNAM, los análisis de laboratorio se hicieron en la UIRH.

Como puede observarse en los datos de la tabla 3, en las cinco mujeres que se dispone de suficientes muestras (M1, M2, M3, M4 y M6) se observó que hubo una disminución de la carga viral de la muestra basal ($X= 157,389$ copias RNA/mL plasma) a la muestra del momento del parto ($X= 33,287$ copias de RNA/mL de plasma).

En términos de CD4 en M1 se observa un aumento considerable y sostenido, mientras que en M2 y M3 no se observan valores significativamente diferentes. En las otras 4 pacientes solo hay datos de una muestra. En todos los casos la relación de células CD4/CD8 permaneció constante.

En las mujeres M5 y M7 no fue posible tomarles una segunda muestra, por lo que en estos casos se ignora el efecto que tuvo el tratamiento con AZT en los niveles de carga viral y CD4.

TABLA 3. Mujeres embarazadas VIH-positivas que ingresaron al Protocolo de Prevención de la Transmisión Materno-Infantil del VIH por Detección Temprana y Tratamiento con AZT .

MUJER	MUESTRA DE SANGRE	TIEMPO DE GESTACION (meses)	TRATAMIENTO ^c	CARGA VIRAL (copias RNA/mL plasma)	No. de células CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (células/ μ L sangre)
M1	1	6 meses	Inicio tx	12,670	305/602
	2	8 meses	SI (oral)	3,714	472/703
	3	PARTO	SI (I.V.)	2,178	NR
	4	4 meses postparto	NO	787	505/844
	5	11 meses postparto	NO	1,309	740/1094
M2	1	6 meses	Inicio tx	13,545	190/592
	2	7 meses	SI (oral)	1,602	221/586
	3	PARTO	SI (IV)	5,979	189/779
	4	1 mes postparto	NO	4,022	270/757
	5	3 meses postparto	NO	1,337	221/657
	6	6 meses postparto	NO	35,978	283/939
	7	9 meses postparto	NO	BND	370/887
M3	1	5 meses	Inicio tx	136,660	52/671
	2	7 meses	SI (oral)	135,700	61/785
	3	8 meses	SI (oral)	NR	75/875
	4	PARTO	SI (I.V.)	34,062	76/1188
M4	1	6 meses	Inicio tx	5,392	NR
	2	7 meses	SI (oral)	25,332	338/595
	3	PARTO	SI (I.V.)	2,233	NR
M5	1	5 meses	Inicio tx	23,804	171/474
M6	1	5 meses	Inicio tx	618,679	NR
	2	PARTO	SI (I.V.)	90,931	135/490
M7	1	PARTO	NO	10,209	NR

Tiempo de gestación; ^c tratamiento con AZT de la mujer durante su embarazo, parto y post-parto. IV: AZT administrado por vía intravenosa; NR: No realizado; BND: Bajo Nivel de detección < 500 copias/mL de plasma.

En la tabla 4, se observan los resultados obtenidos de los 6 niños y 1 niña que nacieron de estas mujeres. En todos los casos se observa una disminución progresiva de anticuerpos anti-VIH de tipo IgG en el seguimiento, mostrando una edad promedio de 12 meses para la seroreversión. En los niños N1, N4 y N7 no se detectaron anticuerpos anti-VIH de tipo IgA en ninguna de las muestras, mientras que en los niños N2, N3, N5 y N6 tuvieron al menos una determinación positiva. El aislamiento viral por cocultivo y la detección de antígeno p24 en plasma fueron negativos en todas las muestras de los niños. En cuanto al PCR, en los niños N1, N2, N3, N5 y N6 se detectó DNA proviral en al menos una de las muestras, en los niños N4 y N7 no se detectó DNA proviral en ninguna de las muestras analizadas. La carga viral fue detectada en al menos una de las muestras de los niños N1, N2, N3, N4 y N7. En el niño N6 no se detectaron copias de RNA viral/mL de plasma en la única determinación que se realizó y en el niño N5 no fue posible hacerle ninguna determinación. Con estos resultados de laboratorio, en ningún caso se diagnosticó infección por VIH.

Tabla 4. Resultados de los exámenes de laboratorio realizados en las muestras de los niños que nacieron de mujeres VIH-positivas que ingresaron al protocolo de tratamiento con AZT

Niño	Muestra ^o	Edad del Niño	ELISA-IgG*	ELISA-IgA*	Cultivo	PCR	p24	carga viral ¹
N1	1*	< 1 hora	>19	0.149	(-)	(-)	(-)	4,914
	2	4 meses	>19	0.349	(-)	(+)	(-)	1,062
	3	8 meses	12.7	0.499	(-)	(+)	(-)	3,183
	4	13 meses	0.635	0.505	(-)	NR	(-)	BND
	5	21 meses	0.132	0.382	(-)	(-)	(-)	BND
N2	1*	< 1 hora	>19	0.124	(-)	(-)	(-)	1,770
	2	1 mes	>19	0.201	(-)	(+)	(-)	5,669
	3	3 meses	>19	0.427	(-)	(+)	(-)	764
	4	8 meses	7.333	1.266	(-)	(+)	(-)	4,112
	5	16 meses	0.251	0.702	C	(-)	(-)	BND
N3	1*	< 1 hora	>19	0.216	(-)	(+)	NR	BND
	2	4 meses	NR	1.428	(-)	NR	(-)	BND
	3	6 meses	>19	0.632	(-)	NR	(-)	668
	4	9 meses	8.729	0.599	C	(-)	(-)	BND
	5	12 meses	1.477	1.514	(-)	(+)	(-)	NR
	6	15 meses	0.226	1.222	(-)	(+)	(-)	NR
	7	19 meses	.199	1.036	(-)	(-)	(-)	NR
N4	1*	<1 hora	>19	0.107	(-)	(-)	(-)	11,870
	2	3 meses	>19	0.360	(-)	NR	(-)	1,333
	3	6 meses	>19	0.424	(-)	(-)	(-)	NR
	4	10 meses	8.471	0.862	(-)	(-)	(-)	NR
	5	15 meses	0.159	0.280	(-)	(-)	(-)	NR
N5	1	10 d	>19	0.177	(-)	(+)	(-)	NR
	2	7 meses	1.974	2.209	(-)	NR	(-)	NR
N6	1	9 h	>19	0.125	(-)	(-)	(-)	BND
	2	5 meses	14.792	0.952	(-)	(+)	(-)	NR
	3	8 meses	1.628	1.031	(-)	NR	(-)	NR
N7	1	2 semanas	>19	0.179	(-)	NR	(-)	3,909
	2	2 meses	>19	0.386	(-)	(-)	(-)	BND
	3	5 meses	16.522	0.780	(-)	(-)	(-)	NR

NR: No realizado; C: Cultivo contaminado; BND: Bajo Nivel de detección <500 copias/mL plasma; *A/V.C.: Absorbancia/valor de corte; ¹ Copias de RNA/mL de plasma; * Muestra de sangre tomada de cordón umbilical; ^o Muestra de sangre completa colectada con anticoagulante en condiciones estériles.

DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR VIH EN LOS NIÑOS DEL GRUPO B.

El diagnóstico de los niños incluidos para medir respuesta linfoproliferativa se muestra en la tabla 5, solo tres de estos niños recibieron tratamiento con AZT. De los 24 niños analizados; 15 de ellos se consideraron como no infectados y 9 como infectados de acuerdo a los resultados obtenidos de cultivo considerado como la prueba de "oro".

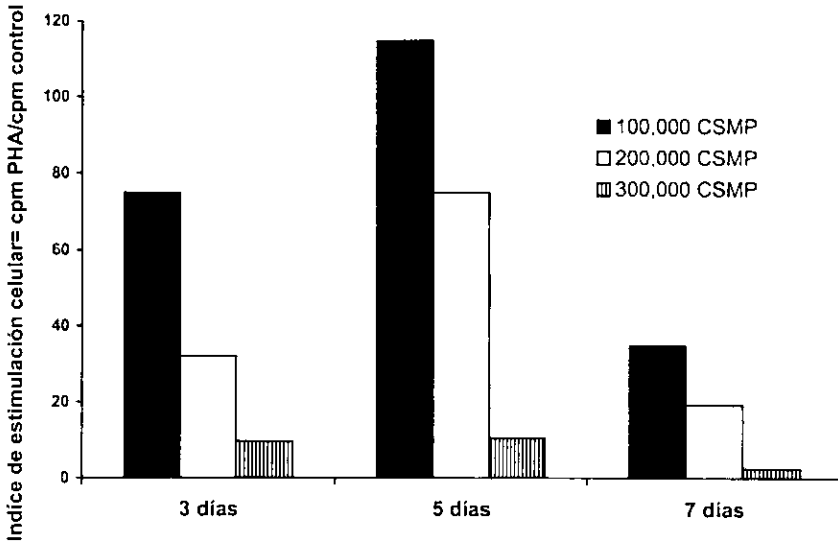
Tabla 5. Diagnóstico pediátrico de infección por VIH en los 24 niños del grupo B

	EDAD	Tratamiento	IgG	IgA	CULTIVO	PCR	Ag p24
INFECTADOS							
P330	3m	no	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
P362	5m	?	(+)	(+)	(+)	NR	(+)
P331	7m	no	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
P338	9m	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
P285	9m	?	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
P237	19m	?	(+)	(-)	(+)	NR	(-)
P264	22m	no	(+)	(-)	(+)	NR	(+)
P280	24m	no	(+)	(+)	(+)	NR	(-)
P268	29m	si	(+)	(-)	(+)	NR	(-)
NO IINFECTADOS							
P293	2d	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P294	2d	AZT	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
P278	3m	AZT	(+)	+/-	(-)	NR	(-)
P279	4m	no	(+)	+/-	(-)	(-)	(-)
P360	6m	?	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
P260	7m	?	(+)	(-)	(-)	NR	(-)
P246	7m	?	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P361	9m	?	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
P335	11m	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P245	12m	no	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
P213	12m	?	(-)	(-)	(-)	NR	(-)
P263	12m	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P350f	22m	no	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
P262	24m	no	(-)	(-)	(-)	NR	(-)
P271	24m	?	(-)	(-)	(-)	NR	(-)

NR No realizado. ? No se tiene el dato.

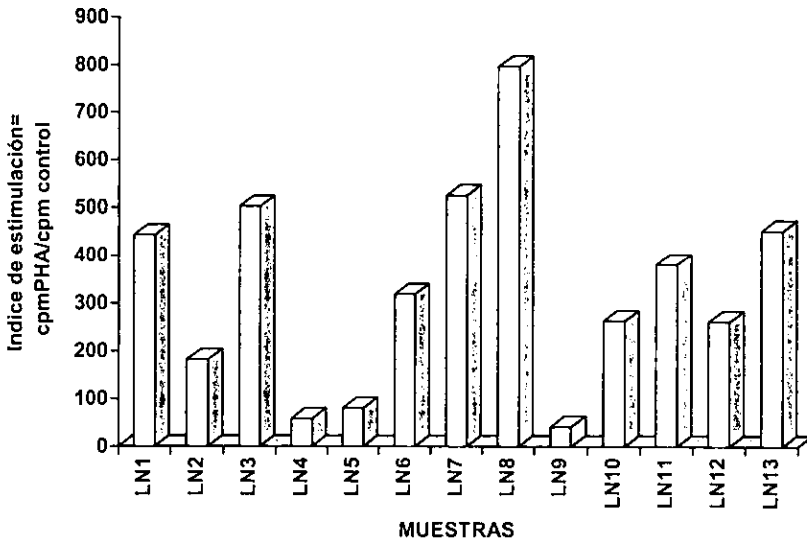
ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE LINFOPROLIFERACION CELULAR

Los resultados obtenidos en la estandarización de la técnica a los 3, 5 y 7 días de incubación empleando 100, 200 y 300 mil CSMP/ pozo según se explica en materiales y métodos se muestran en la gráfica 2. Con estos resultados se decidió trabajar con 100,000 CSMP/ pozo e incubar durante 5 días ya que a estas condiciones se obtiene un máximo de respuesta proliferativa utilizando fitohemaglutinina (PHA) como control máximo de proliferación celular.

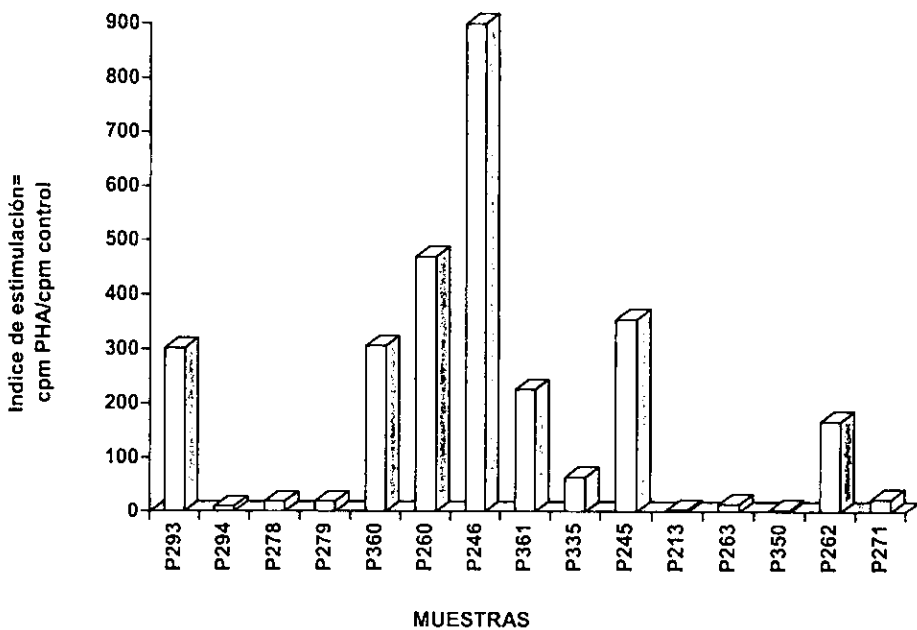


Gráfica 2. Índices de estimulación celular obtenidos durante la estandarización del número de células y tiempos de incubación. Se estimularon 10^5 , 2×10^5 , y 3×10^5 células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) con fitohemaglutinina (PHA) durante 3, 5 y 7 días. La proliferación celular se determinó mediante ensayos de incorporación de ^3H -Timidina. El índice de estimulación fué calculado con la fórmula: $\text{IE} = \frac{\text{cpm PHA}}{\text{cpm control}} \times 100$, según se indica en materiales y métodos

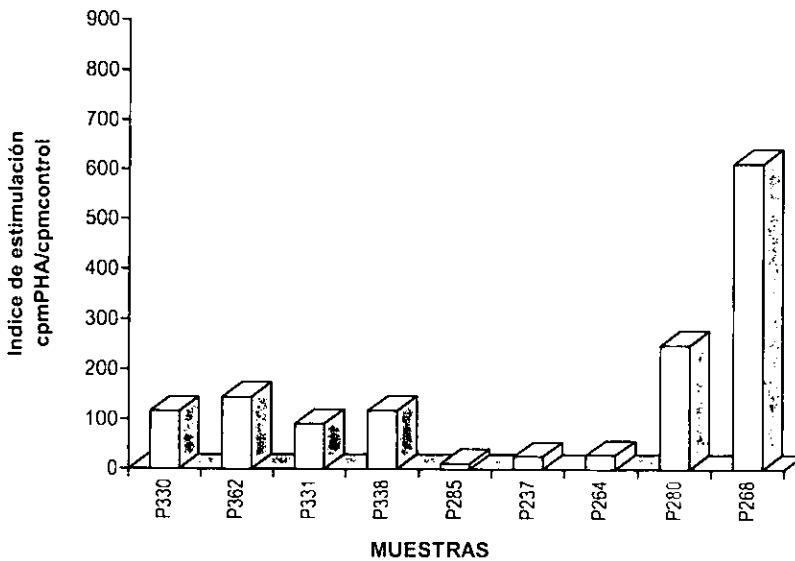
Todas las muestras de los niños involucrados en este estudio y las muestras de adultos sanos no infectados con VIH utilizados como controles negativos de linfoproliferación antígeno-específico fueron probados para ver su máxima capacidad de linfoproliferar con PHA. Los resultados obtenidos con cada uno de los grupo estudiados se muestran en las gráficas 3, 4 y 5 .



Gráfica 3. Índices de estimulación celular con PHA en CSMP obtenidas de adultos sanos VIH-negativos. Se estimularon 10^5 células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) con PHA durante 5 días. La proliferación celular se determinó mediante ensayos de incorporación de ^3H -Timidina. El índice de estimulación fué calculado con la fórmula: $IE = \frac{\Delta \text{cpm PHA}}{\text{cpm control}} \times 100$, según se indica en materiales y métodos.



Gráfica 4. Índices de estimulación celular con PHA en CSMP obtenidas de niños no infectados con el VIH-1. Se estimularon 10^5 células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) con PHA durante 5 días. La proliferación celular se determinó mediante ensayos de incorporación de ^3H -Timidina. El índice de estimulación fué calculado con la fórmula: $IE = \Delta \text{cpm PHA} / \Delta \text{cpm control} \times 100$.



Gráfica 5. Índices de estimulación celular con PHA en CSMP obtenidas de niños infectados con el VIH-1. Se estimularon 10^5 células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) con PHA durante 5 días. La proliferación celular se determinó mediante ensayos de incorporación de ^3H -Timidina. El índice de estimulación fué calculado con la fórmula: $IE = \Delta \text{cpm PHA} / \Delta \text{cpm control} \times 100$.

En las gráficas anteriores, se observa que la capacidad de proliferar ante la PHA es distinta para cada individuo. No obstante, al comparar las tres gráficas se puede apreciar que los Índices de Estimulación (IE) de los donadores adultos sanos-VIH-negativos ($X= 331$) (gráfica 3) son valores más altos que los IE obtenidos de los niños no infectados ($X= 243.7$) (gráfica 4) y estos a su vez son mayores que los IE de los niños infectados ($X=155.8$) (gráfica 5). Debido a que no se cuenta con un grupo control de niños no expuestos a VIH no se puede afirmar que esta diferencia sea debido a la edad o a la exposición y/o infección por VIH.

ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACION VIH-ESPECIFICA

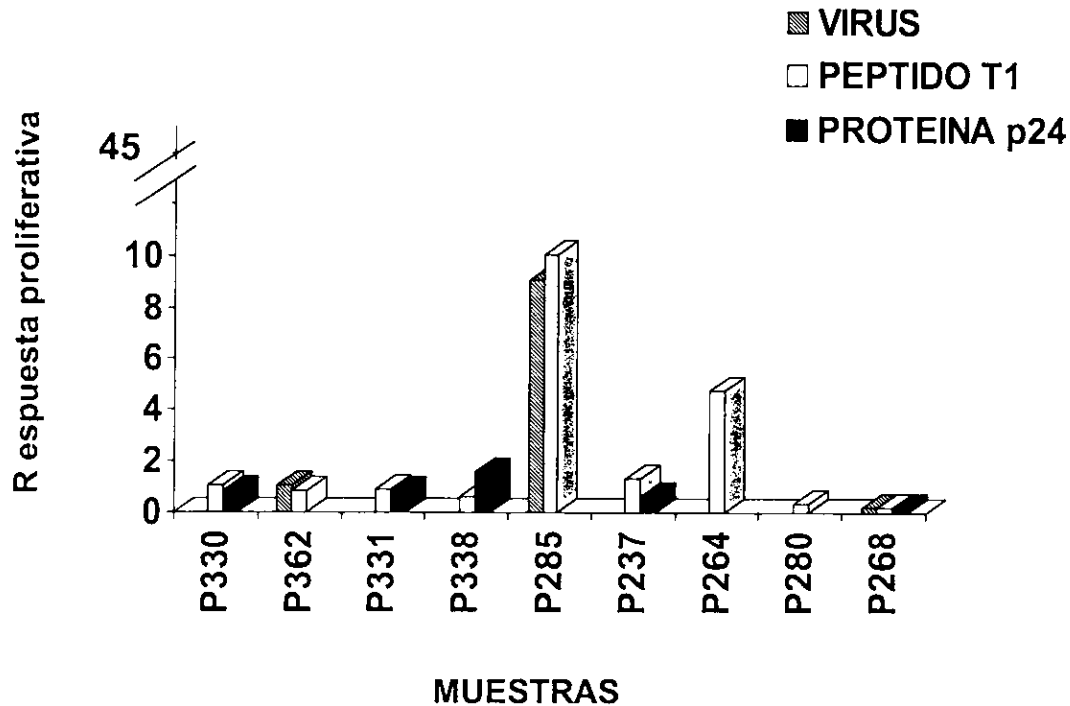
Como se muestra en la tabla 5 los tres antígenos virales utilizados en este estudio inducen una respuesta linfoproliferativa tanto en algunos niños infectados como en algunos niños no infectados. No obstante, las células de los niños no infectados que responden mostraron respuestas proliferativas mayores. (Gráfica 7). Siete de 15 niños no infectados respondieron al péptido T1 con una respuesta proliferativa mayor a 2.0 (P294, P278, P279, P213, P263, P262, P271). Sin embargo en los niños infectados solamente 2 de 9 mostraron respuesta al mismo péptido (Gráfica 6)

Para la proteína p24, se encontró respuesta en 3 de 5 niños no infectados (P278, P335 y P213) y en ninguno de los 5 niños infectados.

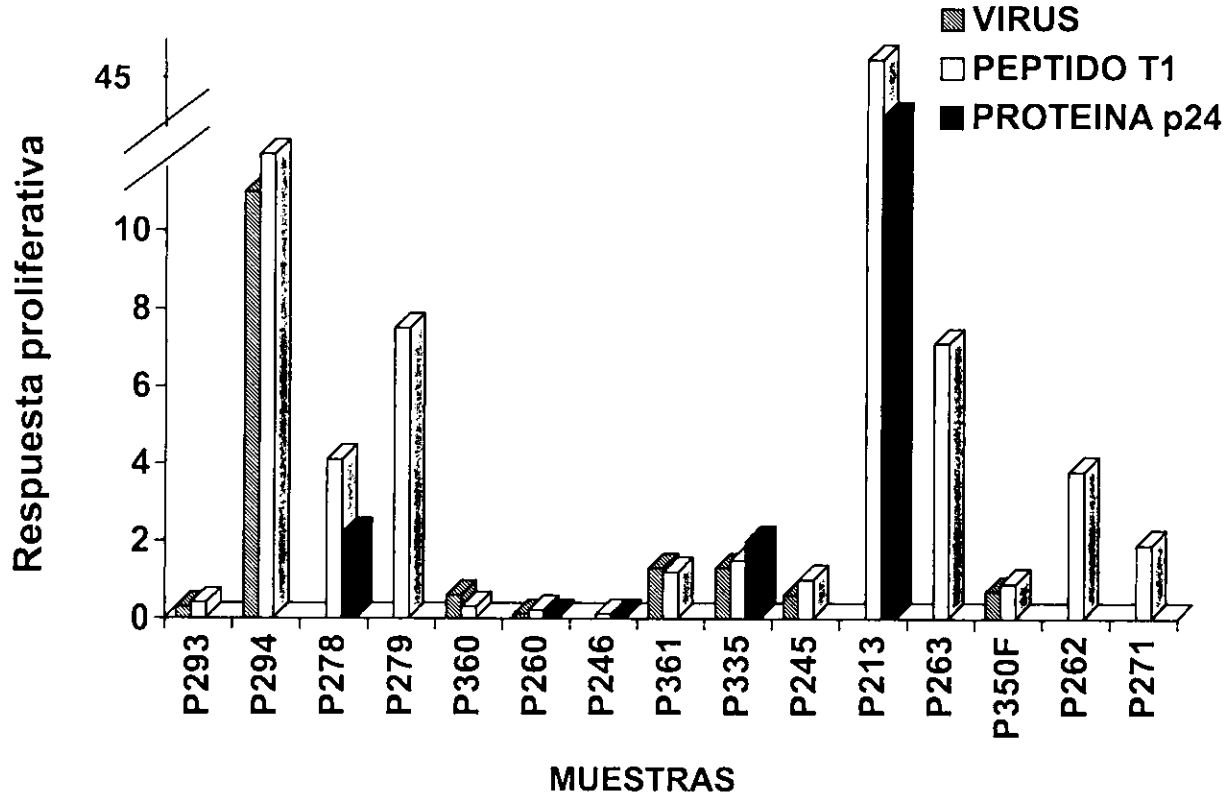
El virus completo IIIb indujo respuesta proliferativa en 1 de 8 de los niños no infectados (P294) y 1 de 4 de los niños infectados (P285).

Tabla 5. Resultados de linfoproliferación VIH-específico en los niños del grupo B.

	NIÑOS VIH-1 INFECTADOS	NIÑOS NO INFECTADOS
Virus completo	1 de 4 (25%)	1 de 8 (12%)
Péptido T1	2 de 9 (22%)	7 de 15 (47%)
Proteína p24	0 de 5 (0%)	3 de 5 (60%)
Total de niños analizados	9	15



Gráfica 6. Respuesta proliferativa VIH-específica en niños infectados. Se estimularon 10^6 células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) con VIH de la cepa IIIb, con el péptido viral T1 y con la proteína recombinante p24. El control máximo de linfoproliferación se obtuvo estimulando a las CSMP con fitohemaglutinina (PHA). El control basal de linfoproliferación se obtuvo con las células sin estimular. La respuesta linfoproliferativa se obtuvo con la siguiente fórmula: Respuesta proliferativa = Índice de estimulación celular obtenida con PHA / Índice de estimulación celular obtenida con los antígenos virales $\times 100$, como se explica en materiales y métodos



Gráfica 7. Respuesta proliferativa VIH-específica en niños no infectados. Se estimularon 10^6 células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) con VIH de la cepa IIIb, con el péptido viral T1 y con la proteína recombinante p24. El control máximo de linfoproliferación se obtuvo estimulando a las CSMP con fitohemaglutinina. El control basal de linfoproliferación se obtuvo con las células sin estimular. La respuesta linfoproliferativa se obtuvo con la siguiente fórmula: Respuesta proliferativa = Índice de estimulación celular obtenida con PHA / Índice de estimulación celular obtenida con los antígenos virales $\times 100$, como se explica en materiales y métodos.

ESTA TERCERA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

V.- DISCUSION DE RESULTADOS

Por datos de la Jurisdicción Sanitaria de Cd. Nezahualcóyotl consta que hubo alrededor de 13.000 embarazos entre diciembre de 1996 y agosto de 1998, por lo que con el Programa de PTMI del VIH-1 se logró cubrir alrededor del 50% de mujeres embarazadas en esa zona y en ese rango de tiempo.

El número de muestras de mujeres embarazadas que se tomaron en los centros de salud participantes en el programa fue diferente. En la tabla 2 se observan casos como el del Centro de Salud Vergelito en el cual se tomaron 29.9% (1,928 muestras) del total, mientras que en algunos otros centros sólo se colectó una. La gran diferencia entre los centros se debió en gran medida a la disposición del personal de salud para participar en el programa. También se observa una distribución heterogénea en cuanto a muestras positivas y falsas positivas. Por ejemplo, en el Centro de Salud Maravillas se encontró una concentración alta de casos positivos (30% del total), mientras que en el Centro de Salud Aurora se encontraron la mayoría de los resultados falsos positivos (36%). Se desconocen las causas de esta heterogeneidad, algunos factores que podrían ayudarnos a explicarlas serían: la residencia de un alto número de ex-donadores remunerados en estas áreas, o bien fenómenos sociales como sexo remunerado o drogadicción local.

Es importante hacer notar que las 7 mujeres incluidas en este estudio fueron detectadas en etapas avanzadas de su embarazo, el tiempo promedio de gestación fue de 28 semanas con un rango de 20 a 35 semanas.

Un punto importante para analizar en este protocolo es la toma del medicamento por parte de las mujeres embarazadas, ya que se observó que varias de las mujeres suspendieron temporalmente el medicamento, generalmente esto sucedió por olvido según nos indicaron algunas de las participantes. De acuerdo a esta experiencia se puede concluir que una intervención preventiva ideal sería aquella que fuera de una sola administración, barata para que pueda ser aplicada en aquellos lugares en los que no se cuenta con suficientes recursos económicos y no tóxica.

Se ha reportado que con el tratamiento con AZT en mujeres embarazadas hay una reducción en el riesgo de la transmisión hasta 8%, esto es, menos de un niño infectado por cada 10 mujeres embarazadas bajo tratamiento ⁴⁶. Debido a que el grupo que ingresó al

protocolo de tratamiento fue de 7, no fue posible conocer la eficiencia del tratamiento con AZT, es importante destacar que es necesario que el grupo en estudio sea mayor para poder obtener el riesgo de transmisión vertical del VIH-1 que existe en México en mujeres que reciben tratamiento con AZT.

De acuerdo a los resultados de laboratorio ninguno de los niños que nacieron de estas 7 mujeres está infectado. Analizando los resultados del diagnóstico perinatal que se muestran en la tabla 4 se observa que el cultivo viral y la detección de antígeno p24 en plasma han sido negativos en todos los casos. Se presentó un promedio de edad de serorreversión de 12 meses. Es importante mencionar que una serorreversión en niños nacidos de mujeres infectadas no significa que estos niños no estén infectados, Soler y colaboradores⁴⁷ y Newell y colaboradores⁴⁸ demostraron que hay niños infectados con VIH que no son capaces de desarrollar una respuesta inmune humoral específica contra el virus.

De acuerdo a los criterios que se emplean para diagnosticar niños menores, en ningún caso se puede afirmar que estos niños están infectados con el VIH, no obstante, los resultados obtenidos de laboratorio nos sugieren que estos niños tuvieron contacto con el virus.

Nuestros resultados concuerdan con un gran número de estudios de transmisión materno-infantil del VIH donde se han descrito varios casos en los que se encuentran niños seronegativos con resultados de cultivo viral, p24, PCR o carga viral transitoriamente positivos^{49, 50 51 52}

Las posibles explicaciones que pudieran permitirnos entender el hecho de que estos niños hayan tenido contacto con el virus y no se infecten son:

- Que el virus detectado por PCR o carga viral sea virus defectuoso, que en el caso del PCR se trate de DNA viral circular no integrado al genoma celular o bien virus integrado que no logró ensamblarse⁵² y en el caso de la carga viral que las copias de RNA viral detectado provengan de partículas virales defectuosas o no infectivas y en ambos casos no se logró infectar células del bebé pero permanecen transitoriamente durante un determinado tiempo antes de eliminarse por completo.

En el caso de la metodología para cuantificar moléculas de RNA viral, la cual consiste en la detección de híbridos RNA-DNA mediante anticuerpos monoclonales, se ha reportado en la literatura que pueden dar resultados falsos positivos con valores ligeramente superiores al límite de detección de 500 copias/ mL de plasma⁵³, por lo que en el caso del niño N3 y en la muestra tomada a los 6 meses de edad que presenta 668 copias de RNA viral/ mL de plasma, es factible que sea un falso positivo.

- Que el contacto del niño con el virus haya sido a través de células infectadas de origen materno. Se ha reportado en la literatura que en algunas lesiones patológicas de la placenta es posible el paso de células maternas al feto ⁵⁴. Sin embargo, aunque se considera un evento poco frecuente, se desconoce la cantidad de células infectadas que puedan pasar a través de placenta y el tiempo en que estas células permanecen en el bebé.

- Que las células del recién nacido hayan estado infectadas pero que los niños hayan desarrollado una respuesta inmune efectiva contra el virus y contra las células infectadas que permitieron la eliminación del virus y/o células infectadas.

Entender el mecanismo por el cual estos niños logran eliminar el virus, ya sea en base a las características biológicas de los virus o en base a la respuesta inmune del huésped podría tener grandes implicaciones para las terapias y el desarrollo de vacunas en el futuro.

Debido a que no se excluye la posibilidad de que algunos de estos niños tengan una infección "silenciosa" o "escondida" en algunos sitios tales como nódulos linfáticos o cerebro ⁵⁴, es necesario que se les continúe dando un seguimiento.

También es posible que el tratamiento profiláctico con AZT en los niños pudiera influenciar en la capacidad para detectar el virus por los métodos directos de diagnóstico.

En lo referente a los ensayos de linfoproliferación realizados en los niños del grupo B no se encontró correlación con la edad o tratamiento antirretroviral con la respuesta proliferativa observada, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mc Kallip y colaboradores⁵⁵ donde se observa que el AZT no altera la respuesta proliferativa ante antígenos del VIH en ratones que fueron inmunizados con gp120 y tratados con AZT.

VI.- CONCLUSIONES

- * Es posible establecer programas de prevención de transmisión materno- infantil del VIH, para ello es necesario que las autoridades de Salud aumenten esfuerzos en capacitación al personal de salud, en campañas de sensibilización en la población y que se aseguren medicamentos antirretrovirales a toda mujer embarazada detectada VIH-positiva.
- * Hubo una disminución de la carga viral al administrar el AZT en las mujeres embarazadas.
- * Los antígenos virales utilizados tienen la capacidad de inducir la proliferación de las CSMP de los niños no infectados mucho más que los niños infectados, lo cual nos puede indicar una posible correlación de la capacidad para reconocer estos antígenos con el hecho de que los niños no se infecten.
- * La transmisión materno-infantil es un problema complejo que debe ser abordado de una manera multidisciplinaria.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 World Health Organization. (1994) AIDS: Images of the epidemiy.
- 2 La epidemia de SIDA: situación en diciembre de 1998. Boletín de ONUSIDA-OMS.
- 3 Quinn T. Global burden of the HIV pandemic. *Lancet* 1996;348:99-106.
- 4 Boletín de Amigos contra el SIDA A:C:<http://www.aids-sida.org>
- 5 SIDA/ETS. En Separata de la revista SIDA/ETS 1999; 3:I-XV.
- 6 Rico B., Liguori A.. Mujeres y VIH/SIDA: Reflexiones sobre la situación actual y algunos retos legislativos. *SIDA/ETS*. 1998; 4: 40-47.
- 7 Cuninham, A.L. et al. 1997. Structure and function of HIV.p17-21. In G. Stewart (ed),*Managing HIV*. 164:17-21.
- 8 Keou F. et al. Transmission materno-foetale du virus de l'immunodeficiency humaine: analys des données récentes, épidémiologiques, immunologiques et virologiques.*Bull. Inst. Pasteur* 1994, 92:3-18.
- 9 Gabiano C. et al. Mother to child transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1: Risk of Infection and correlates of Transmission. *Pediatrics* 1992;90: 369-374.
- 10 Ryder RW Perinatal transmission of the human immunodeficiency virus type Y to infants of seropositive women in Zaire. *N Engl. J. Med.* 1989; 320: 1637-1642.
- 11 Krivine A. et al. HIV replication during the first week of life. *Lancet* 1992; 339: 1187-1189.
- 12 Levy J. Features of HIV transmission. In: *HIV and pathogenesis of AIDS*. p.15-41.
- 13 Fowler MG. and Rogers M. Overview of Perinatal HIV Infection. *J. Nutr.* 1996;126:2602S-2607S.
- 14 Scarlatti G. et al. Interplay of HIV-1 phenotype and neutralizing antibody response in pathogenesis of AIDS *Immunol. Letters* 1996; 51:23-28
- 15 Kenneth et al. 1997
- 16 Devash Y. et al. Vertical Transmission of human immunodeficiency virus is correlated with the absence of high affinity/avidity maternal antibodies to gp120 principal neutralizing domain. *Proc. Natl.Acad. Sci USA* 1990;87:3445-3449.
- 17 Rubinstein A. et al. Maternofetal Transmission of Human Immunodeficiency Virus-1: the role of antibodies to the V3 Primary Neutralizing Domain. *Pediatric Research*. 1993; 33:S76-S79.
- 18 Goedert J. et al. Perinatal Transmission of HIV Type 1: Associations with Maternal Anti-HIV Serological Reactivity. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1994; 10: 1125-1134.
- 19 Mann DL. et al. *J AIDS* 1994, 7:617-622.
- 20 Ljunggren K. et al. Antibodies mediating cellular cytotoxicity and neutralization correlate with a better clinical stage in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *J.Infect. Dis.* 1990; 161:198-202.

-
- 21 Mabondzo A. et al. Relationships between humoral factors in HIV-1-infected mothers and the occurrence of HIV infection in their infants. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102:476-480.
- 22 Autran B. Cytotoxic T-lymphocyte responses to HIV. From primary infection to AIDS. In: *Immunology of HIV infection 1996*, 10:201-228. Sudhir Gupta (ed)
- 23 Zöliner B. et al. Threshold of HIV-1 copy numbers for vertical transmission. *AIDS* 1997; 11:542-543.
- 24 Thea D. et al. The effect of maternal viral load on the risk of perinatal transmission of HIV-1. *AIDS* 1997; 11:437-444.
- 25 Borkowsky W. et al. Correlation of perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 with maternal viremia and lymphocytes phenotype. *J. Pediatr* 1994; 125 345-351.
- 26 Dickover RE. et al. Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. *JAMA* 1996; 275:599-605.
- 27 Scarlatti G. et al. Mother-to-child transmission of HIV-1. *Curr Op. Inf. Dis.* 1995; 8:59-65
- 28 Scarlatti G. et al. Transmission of human immunodeficiency syndrome type 1 (HIV-1) from mother to child correlates with viral phenotype. *Virology* 1993; 197: 624-629.
- 29 Koot M. et al. HIV-1 Biological phenotype in long term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 1992; 6:49-54.
- 30 Von Seiden L. et al. Lack of correlation of virus phenotype(syncytia inducing) with onset and progression of disease in vertically HIV-infected infants.1994 Keystone Symposium: revention and Treatment of AIDS. Hilton Head.SC; January 1994.
- 31 Scarlatti G. et al. Interplay of HIV-1 phenotype and neutralizing antibody response in pathogenesis of AIDS. *Immunology letter* 1996; 51:23-28.
- 32 Kuhn L. et al. Timing of maternal-infant HIV transmission: associations between intrapartum factors and early polymerase chain reaction results. *AIDS* 1997; 11:429-435
- 33 Semba R. et al. Maternal Vitamin A deficiency and mother-to- child transmission of HIV-1. *Lancet* 1994; 343:1593-1597.
- 34 Nahmias A. et al. Hematogenous infections of the placenta an interdisciplinaryand evolutionary perspective. In: *Trophoblast Research* 8:107-136,1994 Miller R and Thiede H. (editors).
- 35 Bryson YJ. Et al. Proposed definition for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1 [letter]. *N. Engl. J. Med* 1992; 327:1246-1247.
- 36 Joshi V. Pathology of Pediatric AIDS. In: *Pediatric AIDS* 7: 71-92. 1993. Lymann D., Rubinstain (editors).
- 37 Borkowsky W. et al. Lymphocyte Proliferative Response to HIV-1 Envelope and Core Antigens by Infected and Uninfected Adults and Children. *AIDS Res. Hum. Ret.* 990.6:673-678.
- 38 Mcfarland EJ. et al. *J. Inf. Dis.* 1994; 170:766-774.
- 39 Luzuriaga K. et al. HIV-1-Specific cytotoxic T lymphocyte Response in the first year of Life. *J. Immunol.* 1995; 154:433-443.

- 40 Rollide E. et al. Helper responses in children infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Pediatr.* 1991; 118:724-730.
- 41 Connor et al. Reduction of Maternal-Infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudina treatment. *N. Eng. J Med* 1994; 331: 1173-1180.
- 42 Lorenzi P. et al. Safety of combined antirretroviral therapies with or without protease inhibitors in pregnant HIV-infected women and their offspring. Abstract 32453 XXII International Conference on AIDS. Geneva. 1998.
- 43 Read J. Mode of delivery and vertical transmission of HIV-1: A meta-analysis from fifteen prospective cohort studies (the International Perinatal HIV Group). Abstract 23603. XXII International Conference on AIDS. Geneva. 1998.
- 44 Recomendaciones para el manejo de la mujer embarazada con infección por VIH. Editado por la Secretaría de Salud.
- 45 Gartner S. and Popovic M. *Techniques in HIV Research.* Stockton Press 1990. Anna Aidovini and Bruce D.Walker (editors).
- 46 *Reduction of Perinatal Transmission of HIV: A Guide for Providers.* By: Columbia School of Public Health, National Pediatric and Family HIV resource Center and AIDS Education and Training Center. May 1996.
- 47 Soler C. et al. *Salud Pública de México*
- 48 Newell M. et al. Detection of virus in vertically exposed HIV-antibody -negative children. *Lancet* 1996; 347:213-215
- 49 Borkowsky W. et al. Human immunodeficiency virus type 1 antigenemia in children. *J. Pediatr* 1989; 114:940-945.
- 50 Frenkel L. et al. Genetic Evaluation of Suspected Cases of Transient HIV-1 Infection of Infants. *Science* 1998; 280: 1073-1076.
- 51 Bryson Y. et al. Clearance of HIV Infection in a perinatally infected Infants. *N.Eng. J.Med.* 1995; 332: 833-838.
- 52 Baur A. et al. Continuous clearance of HIV in a vertically infected child. *Lancet* 1989; 2:1045
- 53 Valente P. et al. Role of the placenta in Perinatal transmission of HIV. *Obstet Gynecol. Clin. North Am.* 1990; 17: 607-616.
- 54 Pantaleo G. et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355-358.
- 55 McKallip R et al. Immunotoxicity of AZT: Inhibitory effect on Thymocyte Differentiation and Peripheral T Cell Responsiveness to gp120 of Human Immunodeficiency Virus. *Toxicology and applied pharmacology* 1995;131: 53-62
- 56 De Rossi et al. Antigen detection, virus culture, polymerase chain reaction, and in vitro antibody production in the diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection. *AIDS* 1991; 5:15-20.

-
- 57 Lymphocyte apoptosis in HIV infection. Oyaiz N., and Pahwa S. In: Immunology of HIV infection 3: 133-159, 1996. Gupta S. (editors).
- 58 Rossi ME. Et al. High levels of IgA in HIV-1- perinatally- infected children. Antigen specificity and possible role of substance P plasma levels. Pediatric Allergy Immunol. 1994, 5: 240-243.