

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ACTIVIDAD DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES MATERNOS CONTRA VIH Y SU ASOCIACION CON LA TRANSMISION PERINATAL DEL VIRUS

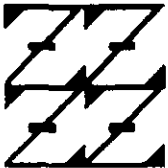
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

HECTOR ANTONIO AGUILAR ORTIGOZA

U N A M FES ZARAGOZA



LO HUMANO ES DE NUESTRA DEFLEXION

DIRECTORA DE TESIS M. en C. CARMEN SOLER CLAUDIN

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

276644



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos (UIRH) del IIB de la UNAM y de la Subsecretaría de *Prevención y Control de Enfermedades*, SSA.

El examen profesional se realizó un 22 de noviembre y la huelga estudiantil en la UNAM aún seguía.

Para mis papás Angel y Luz María,
porque con el tiempo los voy queriendo aún más.

Para mis hermanos Angel, José, Clara, Silvia, Jaime y Elvia
por apoyarme en todo momento.

Para mi sobrino José Emilio.

Va mi resto:
Para mis primos, tíos, cuñados, sobrinos, etc.

Para mi chica,
porque siempre serán pocas las palabras
para expresar lo que siento por ella.

Para Gaby Ramírez,
donde quiera que se encuentre.

Para la UNAM que hoy sufre los embates
de ultras de todos lados.

AGRADECIMIENTOS.

A mis compañeros y amigos de la FES Zaragoza por tantos momentos compartidos, especialmente para: Luis Miguel, Armando, Javier, Jaime, Paty, Lidia, Verónica, Elena, Claudia, Nancy, Myrna, Eliseo y Manuel.

A la Dra. Carmen Soler por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

A la Q. F. B. Laura Adalid y a la M. en C. Patricia Alcántara por su apoyo, consejos, sugerencias y sobre todo por su amistad manifiesta.

A mis compañeros y amigos de la UIRH, por hacer de mi estancia en el laboratorio un aprendizaje científico y ético.

A la Q. F. B. Yolanda Flores y al Q. F. B. Luis Mora por su apoyo para la realización del examen profesional.

A todas las personas que han influido y contribuido a mi formación académica.

Te conozco.

De niño te conocí
entre mis sueños queridos,
por eso cuando te ví
reconocí mi destino.

Cuando pensaba
que ya no iba a ser,
lo que soñara
de pronto vino.

Tanto que yo te busqué
y tanto que no te hallaba,
que al cabo me acostumbré
a andar contando de nada.

Cuanto nos puede curar el amor,
cuanto renace de tu mirada.

Te conozco,
te conozco desde siempre
desde lejos.

Te conozco,
te conozco como aun sueño
bueno y viejo.

Es por eso que te toco
y te conozco.

Silvio Rodríguez.

Somos pasajeros
en tránsito por el tiempo,
Somos el paisaje indescifrable,
la mañana que no llega,
la noche que nos ciega.

Somos dos seres extraños
y lo sabemos,
nos enojamos
y exhibimos
lo que nos hace falta.

Somos dos seres que,
como dijo Sabines:
jugamos a tatuar el humo.

Héctor Antonio Aguilar.

INDICE

RESUMEN	1
FUNDAMENTO TEÓRICO	2
1. EPIDEMIOLOGÍA	2
2. BIOLOGÍA DEL VIH	3
2.1 Estructura del virus	3
2.2 Ciclo viral	5
2.3 Fenotipo biológico del virus	8
3. PATOGENICIDAD	9
3.1 Vías de transmisión	9
3.2 Infección aguda	10
3.3 Mecanismos de patogenicidad	11
3.4 Progresión a SIDA	12
4. RESPUESTA INMUNE	14
4.1 Respuesta Inmune Celular	14
4.2 Respuesta Inmune Humoral	15
4.2.1 Neutralización viral	16
4.2.2 Epitopos de neutralización	16
4.2.3 Anticuerpos neutralizantes	17
4.2.4 Mecanismos de neutralización	17
5. TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS	18
5.1 Aspectos virales implicados en la transmisión vertical	19
5.2 Aspectos inmunológicos implicados en la transmisión vertical	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
HIPÓTESIS	22
METODOLOGÍA	23
MATERIAL Y REACTIVOS	23
MÉTODOS	25
DIAGRAMA DE FLUJO	29
RESULTADOS	30
1. Cultivo de células MT2	30
2. Obtención de las TCID ₅₀ a diferentes días de la infección aguda	31
3. Ensayos de neutralización del virus prototipo IIIb/Molt	31
4. Cálculo del área bajo la curva de los ensayos de neutralización	37
5. Análisis estadístico	38
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
1. Cultivo de células MT2	40
2. Obtención de las TCID ₅₀ a diferentes días de la infección aguda	40
3. Ensayos de neutralización	41
4. Neutralización y transmisión vertical	45
CONCLUSIONES	48
PROPUESTAS	49
ANEXO 1	50
ANEXO 2	52
BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

La transmisión vertical del VIH depende tanto de factores inmunes como virales. Entre los factores inmunes se encuentran la respuesta inmune humoral (anticuerpos neutralizantes, aumentadores de la infección, ADCC) y la celular (respuesta citotóxica). Los factores virales abarcan el fenotipo del virus y la carga viral entre otros. En esta investigación se estudió la respuesta de neutralización y/o aumento de anticuerpos presentes en los plasmas maternos hacia un aislado viral heterólogo (VIH, IIIb/LAV). Se evaluaron 18 muestras colectadas de 10 madres VIH positivas. De 4 se tienen plasmas seriados tomados durante el embarazo. Los plasmas se evaluaron de un rango de diluciones de 1:40 hasta 1:2560, utilizando aproximadamente 100 Dosis Infeccivas 50 (DI₅₀) del virus en los ensayos de neutralización.

Los resultados indican que de estas mujeres, tres presentan un aumento de la infectividad viral (30%), cuatro neutralizan (40%) y tres muestras presentan un efecto mixto (30%). Al relacionar estos datos con la transmisión del virus, se observó que 2 madres que transmitieron el virus a su hijo presentaron un efecto mixto tanto de neutralización como el de aumento. Los resultados se valoraron mediante una prueba de independencia empleando una ji-cuadrada. Los resultados muestran una correlación entre la transmisión vertical del virus y la respuesta de neutralización y de aumento.

FUNDAMENTO TEÓRICO

1. EPIDEMIOLOGÍA.

Desde sus inicios, la epidemia del VIH/SIDA se ha propagado de manera distinta, en un principio afectó a grupos determinados como los homosexuales y hemofílicos, posteriormente la transmisión fue abarcando a un grupo más heterogéneo y el número de hombres y mujeres heterosexuales infectados fue en aumento, esto trajo consigo que además de la transmisión sexual y sanguínea, se empezara a detectar una tercera vía de transmisión, que es la materno-infantil.

Desde el inicio de la epidemia hasta finales de 1998 se habían infectado más de 47 millones de personas en el mundo, de las cuales 14 millones ya habían fallecido, por lo que un total de 33 millones de personas viven con el VIH/SIDA. El 95% vive en países subdesarrollados y el 42% (13.8 millones) son mujeres. Durante 1998 se produjeron aproximadamente 6 millones de nuevas infecciones, estimándose que cada minuto ocurren 11 infecciones en hombres, mujeres y niños, de las cuales el 36% (2.1 millones) son mujeres correspondiendo a los hombres y niños el resto del porcentaje, en el mismo año se produjeron 2.5 millones de fallecimientos, lo cual representa un incremento comparado con cualquier otro año anterior (ONUSIDA, 1998).

En México, hasta noviembre de 1998 se tenían registrados un total de 57, 975 casos de SIDA, de los cuales 24, 098 personas están vivas (51.7%); se ha estimado que por cada caso de SIDA notificado, hay entre 3 y 4 portadores del VIH que no han desarrollado la enfermedad, lo cual significa que hay un total de 231,902 personas portadoras del virus, que sumadas a las 24,098 dan un total de 256,000 personas viviendo con el VIH/SIDA en nuestro país. En este mismo año se registraron 4,137 casos nuevos de SIDA, estimándose que puede llegar a ser de 6,350 casos correspondiendo a 5455 hombres y 895 mujeres, dando una relación de 6 hombres por cada mujer. La transmisión sexual abarcó un 60.39%, la transmisión sanguínea representó un 8.79%, la transmisión perinatal un 1.37% y la transmisión de origen desconocido fue de un 28.9% (ACSIDA, 1998). El 51.6% de las mujeres infectadas adquirieron el virus por transmisión sexual, de las cuales un porcentaje importante se encuentran en edad reproductora. El 61.5% de las

mujeres embarazadas infectadas transmite el virus a su hijo, lo cual es considerablemente alto si comparamos con la media de otros países que es de 30% aproximadamente (Anaya, 1997).

Hasta 1998 se habían diagnosticado 798 casos de SIDA en niños, de los cuales el 65% fue debido a transmisión perinatal. Este tipo de transmisión ocupaba hace 10 años un 34%, mientras que en la actualidad se incrementó a un 88.4% de los casos de SIDA infantil. En el último año se informaron 107 casos de SIDA perinatal y en 1997 se reportaron 42 casos, lo que significa un aumento del 254% (ACSIDA, 1998).

2. BIOLOGÍA DEL VIH.

Existen en el mundo dos tipos de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), El VIH-1 y el VIH-2. El VIH-1 es el virus más extendido alrededor del mundo y es el tipo más patógeno, mientras que el VIH-2 es menos patógeno pero finalmente ocasiona los mismos daños que el VIH-1. El VIH es un virus ARN que pertenece a la familia Retroviridae y a la subfamilia Lentivirinae, infecta células que expresan el receptor CD4⁺ tales como linfocitos T CD4⁺, macrófagos, células de Langerhans, entre otros. Como otros retrovirus, el VIH transcribe inversamente su información genética para integrarla en el cromosoma de la célula huésped, lo cual es un paso necesario para la replicación viral (Levy, 1993).

2.1 Estructura del virus.

El virión tiene una estructura esférica de aproximadamente 110 nm. de diámetro y está constituido exteriormente por una bicapa de lípidos en la que se encuentran inmersas las glicoproteínas (gp) de envoltura gp120 y gp41 (Fig. 1). La porción interior de la membrana viral está circundada por una cápside o "core" vital para la estructura del virión, formado por la proteína p17 que provee la matriz viral (MA). En el interior de la MA se encuentra un núcleo en forma de cono, compuesto por la proteína p24 (CA), en el que se encuentran incluidas 2 moléculas de ARN, la proteína transcriptasa reversa (TR), la integrasa (IN), la ARNasa H y las proteínas de

mujeres embarazadas infectadas transmite el virus a su hijo, lo cual es considerablemente alto si comparamos con la media de otros países que es de 30% aproximadamente (Anaya, 1997).

Hasta 1998 se habían diagnosticado 798 casos de SIDA en niños, de los cuales el 65% fue debido a transmisión perinatal. Este tipo de transmisión ocupaba hace 10 años un 34%, mientras que en la actualidad se incrementó a un 88.4% de los casos de SIDA infantil. En el último año se informaron 107 casos de SIDA perinatal y en 1997 se reportaron 42 casos, lo que significa un aumento del 254% (ACSIDA, 1998).

2. BIOLOGÍA DEL VIH.

Existen en el mundo dos tipos de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), El VIH-1 y el VIH-2. El VIH-1 es el virus más extendido alrededor del mundo y es el tipo más patogénico, mientras que el VIH-2 es menos patogénico pero finalmente ocasiona los mismos daños que el VIH-1. El VIH es un virus ARN que pertenece a la familia *Retroviridae* y a la subfamilia *Lentivirinae*, infecta células que expresan el receptor $CD4^+$ tales como linfocitos T $CD4^+$, macrófagos, células de Langerhans, entre otros. Como otros retrovirus, el VIH transcribe inversamente su información genética para integrarla en el cromosoma de la célula huésped, lo cual es un paso necesario para la replicación viral (Levy, 1993).

2.1 Estructura del virus.

El virión tiene una estructura esférica de aproximadamente 110 nm. de diámetro y está constituido exteriormente por una bicapa de lípidos en la que se encuentran inmersas las glicoproteínas (gp) de envoltura gp120 y gp41 (Fig. 1). La porción interior de la membrana viral está circundada por una cápside o "core" vital para la estructura del virión, formado por la proteína p17 que provee la matriz viral (MA). En el interior de la MA se encuentra un núcleo en forma de cono, compuesto por la proteína p24 (CA), en el que se encuentran incluidas 2 moléculas de ARN, la proteína transcriptasa reversa (TR), la integrasa (IN), la ARNasa H y las proteínas de

la nucleocápside (NC). En la Tabla 1 se muestran las funciones más importantes de las proteínas del virus (Levy, 1993; Karn 1995).

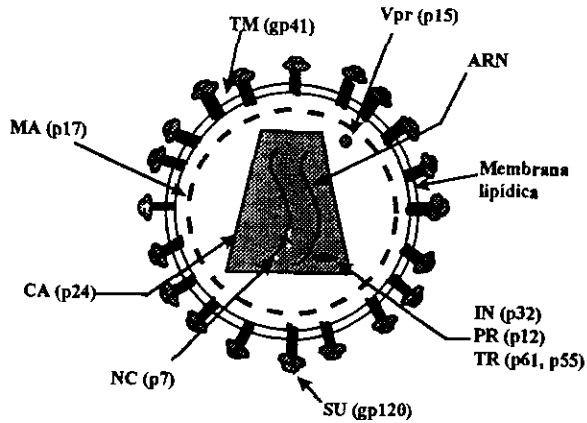


Figura 1. Estructura del VIH. TR Transcriptasa Reversa; NC proteínas de la nucleocápside; MA matriz viral; IN integrasa, CA Cápside, ARN ácido ribonucleico (Levy, 1993).

El genoma del VIH-1 está compuesto por 2 hebras de ARN de aproximadamente 9.2 Kb de longitud, con polaridad positiva con respecto a la traducción. Está constituido por 9 genes de los cuales 2 codifican proteínas estructurales (*env* y *gag*), 1 codifica 3 enzimas (polimerasa, integrasa y proteasa) y 6 codifican 3 proteínas regulatorias de la transcripción (*tat*, *rev* y *nef*) y 3 proteínas accesorias para la replicación viral (*vif*, *vpr* y *vpu*). Flanqueando al genoma proviral se encuentran las regiones LTR (Long Terminal Repeat), las cuales contienen numerosos elementos regulatorios que son importantes para la activación de la expresión genética del virus como se observa en la Fig. 2 (Haseltine 1991).

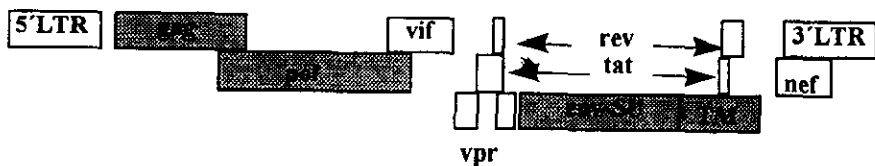


Figura 2. Organización genómica del VIH-1 (Haseltine, 1991).

PROTEÍNA	P. M. (kDa)	FUNCIONES.
Proteínas estructurales:		
Gag	p17	Proteína de la matriz (MA).
	p24	Proteína del core.
	p9	Proteína de la nucleocápside, ensamblaje del virus.
	p6	Proteína de la nucleocápside, rica en prolina.
Pol	p51	Transcribe inversamente el ARN en ADN.
	p66	RNasa H. Degrada la porción ARN de un híbrido ARN-ADN.
Env	gp160	Precursor de las proteínas de envoltura gp120 y gp41.
	gp120	gp de envoltura, enlazamiento al CD4.
	gp41	gp transmembranal, fusión de membranas.
Proteínas regulatorias:		
Tat	p14	Proteína transactivadora; estimula la elongación transcripcional
Rev	p19	Regula la expresión genética.
Nef	p27	Aumenta o disminuye la replicación viral.
Proteínas Accesorias:		
Vpr	p14	Traslación del complejo de preintegración al núcleo. Detiene el ciclo celular en la fase G2.
Vif	p23	Factor de infectividad viral; eventos de preintegración.
Vpu	p16	Maduración de la envoltura y liberación del virus.

Tabla 1. Funciones de las proteínas estructurales, accesorias y regulatorias del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (Haseltine, 1991; Karn, 1995; Wyatt y Sodroski 1998).

2.2 Ciclo viral.

El ciclo de replicación del VIH inicia cuando la región CD4bs (sitio de enlazamiento al CD4, del inglés *CD4 binding site*) de la gp120 viral interacciona y se une al receptor CD4 de la célula huésped. Se cree que esta unión induce cambios conformacionales en la gp120 y en el receptor CD4 que contribuyen a la formación ó exposición del sitio de enlazamiento en la gp120 para el correceptor CCKR5 ó CXCR4 (Wyatt y Sodroski, 1998). La interacción con el correceptor promueve cambios conformacionales adicionales en el complejo gp120-CD4 que pueden ocasionar un corte proteolítico en la región V3 de la gp120 (Clements y cols., 1991), dando como resultado una interacción directa del ectodominio de la gp41 con un glicolípido presente en la célula, ocasionando la fusión de membranas virus-célula (Levy, 1998).

La infección viral también puede ocurrir cuando las células infectadas se fusionan a células no infectadas para formar masas multinucleadas grandes no funcionales conocidas como sincicios. Este tipo de infección célula-célula es 100 veces más eficiente que la infección por partículas virales libres, ya que el virus puede diseminarse rápidamente de una célula a otra sin necesidad de que los viriones estén totalmente formados y ocurre cuando las glicoproteínas de la envoltura del virus se expresan en la membrana de la célula infectada y se unen al receptor CD4 de células no infectadas ocasionando la fusión de membranas (Levy, 1998).

Una vez que el virión ha penetrado en la célula huésped, la proteína celular ciclofilina A (CyPA) induce el desnudamiento del virus desestabilizando a la proteína p17 de la matriz viral (Wiatt y Sodrosky, 1998). En seguida, el genoma del virus es transcrito inversamente por la acción de la transcriptasa reversa para obtener una copia de ADN complementario (ADNc) que puede estar en forma lineal o circular. Este ADNc forma un complejo de preintegración que contiene la proteína p17, Vpr y la proteína integrasa, se transporta al núcleo como una molécula circular donde se integra al cromosoma de la célula (Fig. 3). Para este proceso, la integrasa viral corta 2 nucleótidos de cada extremo 3' del ADNc viral y une los grupos hidroxilo 3' nuevamente expuestos a los enlaces fosfodiéster del ADN huésped (Levy, 1998).

La interacción del factor NFκB celular con el LTR regula la replicación viral (Levy, 1998). El extremo 5' del LTR funciona como un elemento promotor y el extremo 3' provee un signo de poliadenilación (Karn, 1995). El LTR genera 2 poblaciones de transcritos: ARN largos inmaduros y ARN cortos maduros que codifican las proteínas Tat, Rev y Nef y que son transportados fuera del núcleo para la traducción. Los ARNm inmaduros largos sirven para dirigir la síntesis de las proteínas estructurales del virus (Turner y Summers, 1999). Así, los eventos involucrados en la transcripción pueden dividirse en dos fases: una fase inicial en la que las proteínas regulatorias Tat, Rev y Nef son sintetizadas para el control de la transcripción y una fase posterior en la que se sintetizan todas las proteínas virales y durante la cual se van formando las partículas virales (Karn, 1995).

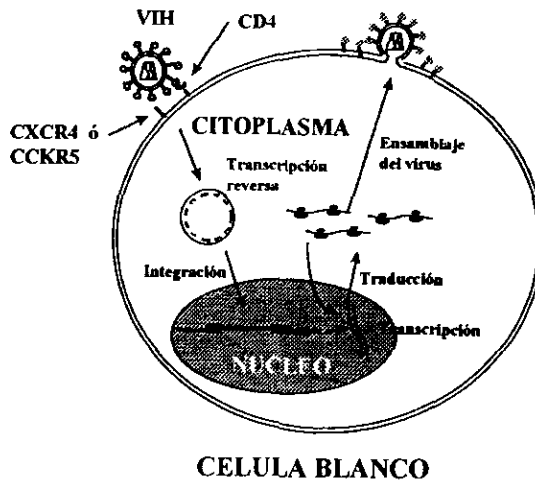


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH. Se muestran los pasos necesarios en la replicación viral: entrada del virus, transcripción reversa, integración, traducción, transcripción, ensamblaje y liberación de los viriones (Karn, 1995).

La transcripción del VIH es regulada por una ARN pol II celular, mientras que Tat actúa a nivel de elongación de la transcripción (Gatignol y cols., 1991). Tat se asocia con la región TAR del ARN viral y estimula la expresión óptima del LTR. La proteína celular ciclina T (CyCT) enlaza directamente a Tat, aumentando la afinidad y especificidad de ésta por la región TAR. La Cdk9 (proteína cinasa-9 dependiente de ciclina) enlaza específicamente al dominio de activación de Tat y fosforila el complejo de transcripción de la ARN pol II, estimulando la elongación de la transcripción (Turner y Summers, 1999). Una vez que los niveles de la proteína Rev son suficientemente altos, inicia el control transcripcional por parte de esta proteína. Rev enlaza a un RRE (elemento de respuesta a Rev), lo cual permite la exportación de ARN que contiene las secuencias codificantes *env*, *gag* y *pol* del núcleo al citoplasma (Haseltine, 1991). Rev provee un balance en la expresión de proteínas estructurales y regulatorias del VIH y estimula la producción de especies de ARN genómico que se empaquetan en los virus infecciosos. (Karn, 1995).

Debido a que las células infectadas tienen un tiempo de vida media de 2 días, la proteína Vpr (14 kDa) extiende el periodo de tiempo de la fase G2 del ciclo celular ya que el LTR es mas

activo en esta fase, por lo que la producción de virus se ve incrementada en células cuya fase G2 está aumentada (Wiatt y Sodrosky, 1998).

El precursor de las glicoproteínas de envoltura gp160 se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso, donde se ensambla en forma de una estructura trimérica a la que se adicionan cadenas de carbohidratos ricos en manosa para la glicosilación. Este precursor se corta en el aparato de Golgi para producir las gp120 y gp41 (Moulard y cols., 1998). Estas glicoproteínas son transportadas a la membrana celular para el ensamblaje del virus donde están expresadas como una estructura oligomérica que comprende 3 heterodímeros de gp120 y gp41, las cuales se encuentran unidas de manera no covalente (Parren y cols., 1997).

La proteína Gag regula el proceso de liberación de los viriones y coordina el empaquetamiento de todos los componentes virales. Una interacción entre Env y Gag excluye proteínas de la célula huésped no necesarias para la envoltura viral y puede organizar la incorporación de moléculas tales como MHC clase I y II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad), moléculas de adhesión, entre otras. Durante la gemación, la p55 es cortada por una proteasa para dar las proteínas estructurales p17, p24 y p15 (Spearman y cols., 1994; Bugelsky y cols., 1995).

2.3 Fenotipo biológico del virus.

El VIH es clasificado en 2 grupos de acuerdo a su fenotipo biológico como IS (inductor de sincicios) y NIS (no inductor de sincicios). Los virus IS son altamente citopáticos, replican rápidamente y a altas concentraciones de antígeno; infectan células MT2, líneas celulares linfocíticas y células mononucleares de sangre periférica (PBMC's, del inglés *Peripheral blood mononuclear cells*) y utilizan como correceptor al CXCR4. Los virus NIS se replican lentamente produciendo concentraciones bajas de antígeno, no infectan células MT2 y por lo general infectan linfocitos y MDM (macrófagos derivados de monocitos) usando como correceptor al CCKR5 (Karlsson y cols., 1994; Moore, 1996). La diferencia entre estos dos tipos de virus es una variación en los genes que expresan el loop V3, lo que ocasiona cambios en el tropismo y

citopatogenicidad que se ve reflejado en el escape inmunológico que puede tener el virus hacia los anticuerpos neutralizantes (Arendrup y cols., 1995; Harrowe y Cheng-Mayer, 1995).

3. PATOGENICIDAD.

La infección por el VIH cursa por tres etapas clínicas que pueden ser clasificadas en:

- a) Infección primaria o aguda, que se caracteriza por un síndrome parecido a la mononucleosis, afecta a aproximadamente del 50 al 70% de los individuos infectados.
- b) Periodo de latencia clínica que tiene una duración variable (3-10 años o más).
- c) SIDA, que se caracteriza por una susceptibilidad a infecciones oportunistas y/o neoplasmas (Haynes y cols., 1996).

3.1 Vías de transmisión.

La transmisión del virus ocurre cuando partículas virales libres o células infectadas se transmiten de un individuo a otro ya sea por vía sexual, por vía sanguínea o por vía materno-infantil.

La transmisión sexual sucede al tener relaciones sexuales sin protección que impida el paso de virus libre o de células infectadas por vía vaginal, anal u oral y se lleva a cabo cuando hay un intercambio de fluidos tales como semen, secreciones vaginales, líquido preeyaculatorio, sangre menstrual, entre otros. Los virus que se transmiten por esta vía son por lo general monocitotrópicos y es debido probablemente a la selección que puede ocurrir al infectar selectivamente a las células presentes en las mucosas expuestas al virus.

Por otro lado, la transmisión sanguínea ocurre cuando productos sanguíneos contaminados por el VIH son introducidos en un individuo sano mediante transfusiones, trasplantes y en accidentes por cortaduras y picaduras con material punzocortante contaminado. En este caso, los

virus que se transmiten pueden abarcar tanto virus IS como NIS, por lo que es probable que el sistema inmune influya al eliminar selectivamente a los virus que replican a altos títulos.

Por último, en la transmisión vertical, el virus puede atravesar la barrera placentaria, lo cual es común en los primeros meses de la gestación; al momento del parto el virus se trasmite a través de las secreciones cérvico-vaginales y mediante transfusiones sanguíneas de la madre al bebé, en el periodo postnatal la transmisión del virus ocurre a través de la leche materna. Los virus transmitidos por esta vía, pueden ser de los dos tipos (IS y/o NIS), aunque por lo general son monocitotrópicos y es debido a que puede ocurrir un escape inmunológico del virus que hace que se transmita más fácilmente (Scarlati, 1996; Rodrigo, 1997).

3.2 Infección aguda.

Cuando el virus penetra al organismo, es acarreado por las células de Langerhans a un ganglio linfático próximo, para ser procesado y generar una respuesta inmune de manera adecuada (Pantaleo y Fauci, 1995). El establecimiento de la infección ocurre en este sitio primario, ya que las células CD4⁺ se activan para contrarrestar la infección y son infectadas por los virus que replicaron en las células de Langerhans (Graziosi y cols., 1998). Ya que el virus se ha establecido en el órgano linfoide, inicia la diseminación viral a través de este órgano (McMichael, 1996). Posteriormente hay un cambio de células produciendo virus a virus atrapado en las células foliculares dendríticas, lo cual es asociado con la transición de la fase aguda a la fase crónica de la infección (Graziosi y cols., 1998).

Este periodo de la infección se caracteriza por un declinamiento en el número de células T CD4⁺, una alta concentración de antígeno p24 y una carga viral que puede llegar a ser de 10⁷ copias/ml. (Piatak y cols., 1993). Durante este periodo el VIH se replica a altos títulos sin ningún control por parte del sistema inmune. Una vez que aparece una respuesta de tipo citotóxica, comienza el declinamiento de la concentración del antígeno p24 y posteriormente aparece una respuesta de anticuerpos. Esta respuesta inmune va a ser un marcador del establecimiento del periodo asintomático o latente de la infección (Ffrench y cols., 1995).

Los síntomas durante la infección aguda son similares a los de otras infecciones virales contándose entre estos a la fiebre, letargia, mialgia, dolor de cabeza y otros más severos tales como faringitis, linfadenopatía y erupciones cutáneas (Ffrench y cols., 1995).

3.3 Mecanismos de patogenicidad.

Después de la fase aguda de la enfermedad, el número de células CD4⁺ regresa a niveles casi normales, entonces empiezan a decrecer a una velocidad de 25 a 60 células/ μ L/año. La cantidad de virus libre en sangre es mínima, aunque en los órganos linfoides el VIH está activo. Esta estimulación crónica del sistema inmune provoca finalmente la destrucción del tejido linfoide y la pérdida de la habilidad para responder al virus y/o a otros patógenos (Pantaleo y Fauci, 1995). La habilidad del VIH para mantener la infección de una manera crónica es resultado de diversos mecanismos tanto inmunes como virales que el mismo ha empleado para el escape inmunológico o para reducir los efectos de la respuesta inmune, entre estos mecanismos destacan:

Mecanismos virales:

- Formación de un grupo de células T CD4⁺ de memoria infectadas de manera latente (reservorios), que son competentes con replicación, con un tiempo de vida media mayor al estimado que es de 1 a 4 semanas (Cavert y Haase, 1998).
- Variantes de escape del VIH al reconocimiento de los LTC's (linfocitos T citotóxicos) durante la infección primaria, lo que ocasiona su persistencia y diseminación en el organismo (Price y cols., 1997).
- El atrapamiento de viriones infecciosos en la superficie de células dendríticas foliculares, provee una fuente continua de virus para la infección *de novo* de células susceptibles que residen y/o migran en el tejido linfoide (Pantaleo y Fauci, 1995; Graziosi y cols., 1998).
- El patrón de glicosilación de la envoltura del VIH puede retrasar o impedir la aparición de anticuerpos neutralizantes (Parren y cols., 1997).

- Nef y Vpu pueden interferir con el reconocimiento de células infectadas por los linfocitos T citotóxicos (LTC) (Levy, 1998).
- Efectos citopáticos del VIH como:
 - Formación de sincicios.
 - Acumulación de ADNc en el citoplasma de la célula que ocasiona muerte celular.
 - Proteínas virales que causan apoptosis en células huésped no infectadas.
 - Permeabilidad celular debida a liberación de viriones.
 - Inducción de apoptosis (Levy, 1998).

Mecanismos inmunes:

- Pérdida de clonas de células T CD4⁺ específicas contra VIH (apoptosis o desgaste inmune) (Graziosi y cols., 1998).
- Pérdida de la respuesta de células T CD4⁺ a antígenos de memoria y a mitógenos (Rosenberg y Walker, 1998).
- Pérdida de clonas de células T CD8⁺ citotóxicas contra VIH (apoptosis o desgaste inmune) (Graziosi y cols., 1998).
- Acumulación inicial de LTC's específicos contra VIH en sangre, comparado con el encontrado en tejidos linfoides (McMichael 1996).
- Respuesta oligoclonal o policlonal por parte de los LTC's al virus que puede ser un marcador de progresión a la enfermedad (Graziosi y cols., 1998).

3.4 Progresión a SIDA.

La progresión a SIDA es diferente en cada individuo, y en esto influyen los factores que se describieron anteriormente. Existen tres tipos de progresión de acuerdo a su rapidez: Un 10% de los individuos infectados desarrollan el SIDA en un periodo de 2 a 3 años (progresores rápidos); un 5 a 10% de los pacientes infectados progresan lentamente (no progresores LTNP, del inglés *long terminal non progresor*) que permanecen asintomáticos por 15 años o más; el porcentaje

restante lo constituyen los progresores típicos los cuales desarrollan el SIDA en un periodo de 10 años aproximadamente (Haynes y cols., 1996).

Los individuos progresores rápidos se caracterizan porque después de la infección aguda la carga viral no disminuye como en el caso de progresores típicos o de LTNP, tienen bajos niveles de anticuerpos contra las proteínas virales, bajo título o ausencia de anticuerpos neutralizantes y puede haber anticuerpos que aumenten la infectividad del virus. El número de células T CD4+ disminuye a una velocidad mayor que el comparado con los progresores típicos y la respuesta de LTC's hacia epítomos del VIH es oligomonoclonal con un repertorio restringido de TCR (receptor de célula T) (Haynes y cols., 1996; Graziosi y cols., 1998).

Los no progresores se caracterizan porque la carga viral permanece a niveles bajos durante mucho tiempo, el número de células T CD4+ permanece prácticamente en niveles considerados como normales, se ha observado la presencia de anticuerpos que neutralizan aislados primarios heterólogos y la respuesta de LTC's hacia epítomos del VIH es policlonal con un repertorio amplio de TCR. Esta respuesta inmune es efectiva para mantener o prolongar la fase latente de la infección por el VIH. En algunos individuos puede estar presente una cepa viral no patogénica o menos infectiva, razón por la cual los no progresores representan un grupo muy heterogéneo (Haynes y cols., 1996; Graziosi y cols., 1998).

Los progresores típicos representan a la mayoría de los individuos infectados. Los LTC's son importantes en la respuesta inmune contra el VIH y los anticuerpos neutralizantes pueden ser también un componente importante de esta respuesta. Los virus aislados del estado latente de la infección son monocitotrópicos, NIS, cambiando posteriormente a virus más citopático conforme progresa la enfermedad (Haynes y cols., 1996; Graziosi y cols., 1998).

4. RESPUESTA INMUNE.

En condiciones normales, el cuerpo humano monta una respuesta inmune contra agentes biológicos causantes de enfermedades, para ello los linfocitos T CD4⁺ coordinan tanto la respuesta inmune celular como la humoral activándose mediante liberación de citocinas y expansión clonal. El fin primordial de esta respuesta es eliminar el agente infeccioso y minimizar sus efectos sobre el organismo. En la infección por el VIH, la respuesta inmune juega un papel relevante en la contención inicial de la infección, aunque no es capaz de eliminar al VIH y esto conlleva a un desajuste en la respuesta inmunitaria hacia el VIH y/o a otros patógenos.

4.1 *Respuesta Inmune Celular.*

Cuando una célula está infectada, algunas proteínas virales pueden ser procesadas por la célula y los péptidos que se generan aparecen como complejos de superficie con moléculas del MHC clase I, esto ocasiona una respuesta efectora por parte de los LTC que reconocen los antígenos expresados en la superficie de las células infectadas y matan a la célula por lisis directa o por liberación de citocinas tales como FNT α/β (factor necrótico tumoral α y/o β) e IFN γ (Interferón γ). Los LTC van dirigidos contra una variedad de antígenos virales, particularmente epitopos de Gag, TR, Nef y glicoproteínas de envoltura. Esta actividad ha sido observada en todas las fases de la infección viral y no declina con la progresión a SIDA (Levy, 1998).

Los LTC han sido encontrados en una variedad de compartimientos anatómicos: sangre periférica, alvéolos bronquiales, ganglios linfáticos, bazo, piel, fluido cerebroespinal y tejido de la mucosa vaginal (Letvin, 1998). En la infección aguda, el número de LTC's específicos son aproximadamente 25% de las células CD8⁺ circulantes; mientras que en la fase crónica, el nivel de las células efectoras es de alrededor de 1% de todas las PBMC's (McMichael, 1996).

Un mecanismo importante es la *Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos* (ADCC, por sus siglas en inglés), en la que se combinan la acción de anticuerpos tipo IgG y

células efectoras usualmente de tipo NK, contra antígenos expresados en la superficie de células infectadas (Ahmad y Menezes, 1996).

4.2 Respuesta Inmune Humoral.

Al periodo comprendido entre la infección primaria y la aparición de una respuesta inmune humoral contra el VIH se le conoce como periodo de ventana, este periodo es muy variable ya que puede ser de 2 meses o más. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B tienen como finalidad neutralizar y eliminar el ag. que indujo su formación y van dirigidos contra proteínas estructurales y en menor medida contra proteínas regulatorias y accesorias del virus (Fig. 4). La respuesta de anticuerpos representa una mezcla compleja de inmunoglobulinas que varían en título, isotipo e idiotipo. En esta respuesta puede haber anticuerpos que neutralicen al virus, anticuerpos que no tengan ningún efecto sobre el virus y anticuerpos que aumenten la infectividad viral (Poignard y cols., 1996b).

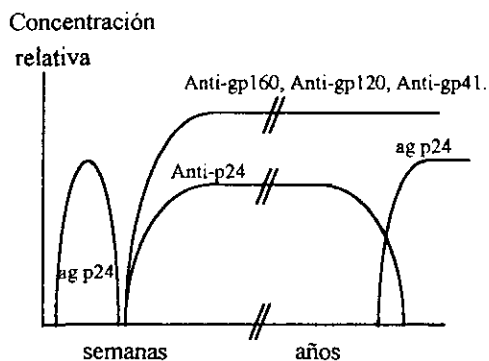


Figura 4. Concentración de anticuerpos a lo largo de la infección por el VIH. Las proteínas de la envoltura viral son muy inmunógenas por lo que la respuesta humoral está dirigida de manera primordial hacia estas glicoproteínas (Karn, 1995).

4.2.1 Neutralización viral.

La neutralización viral se define como la reducción o inactivación de la infectividad de un virus por parte de anticuerpos neutralizantes tanto monoclonales como policlonales; cuando intervienen factores secundarios tales como complemento, ADCC, entre otros, se dice que es una neutralización indirecta, donde puede ocurrir la destrucción del virión. Cuando estos factores no intervienen, se dice que es una neutralización directa, donde los anticuerpos no destruyen al virus pero disminuyen su infectividad (Sattentau, 1996; Poirnard y cols., 1996b). Para que un anticuerpo pueda neutralizar a un virus es necesario que exista una especificidad hacia los epítomos de neutralización, dado que un anticuerpo que no se une al virus no puede neutralizarlo y no todos los anticuerpos que se unen lo neutralizan; así mismo, se ha visto que existe una correlación entre la afinidad del anticuerpo hacia los epítomos de neutralización y el título de neutralización (Zolla Pazner, 1996).

4.2.2 Epítomos de neutralización.

Las glicoproteínas de envoltura son los principales epítomos de neutralización, los anticuerpos van dirigidos contra secuencias de aminoácidos variables o conservados en la gp120 y en la gp41. Existen variaciones en la gp120 que se presentan predominantemente en 5 regiones denominadas V1-V5, que se encuentran intercaladas entre 5 regiones constantes C1-C5. Cada una de las regiones V1, V2, V3 y V4 forman un loop a través de enlaces disulfuro y son las regiones más expuestas del virus (Poirnard y cols., 1996b). Las glicoproteínas están extensamente glicosiladas y los carbohidratos constituyen aproximadamente el 50% del peso molecular, por lo cual ocupan una superficie extensa de la proteína (McKeating, 1996). El patrón de glicosilación de estas glicoproteínas puede retardar o anular la aparición de anticuerpos neutralizantes, por lo que puede explicar por qué existe esta respuesta en ciertos individuos y en otros no (Parren 1997).

4.2.3 *Anticuerpos neutralizantes.*

La aparición de los anticuerpos neutralizantes puede ser variable, debido a que los primeros anticuerpos que aparecen en la infección no tienen capacidad neutralizante. Inicialmente hay una respuesta contra gp160 trimérica que puede ser resultado de una respuesta contra detritos virales derivados de la célula al momento de la liberación de los viriones, o de una respuesta contra gp120 que se separó de la gp41 en el virión o en las células infectadas (*shedding*) (Parren y cols., 1997). Los anticuerpos pueden ser capaces de neutralizar al virus homólogo; sin embargo, es incapaz de neutralizar variantes virales nuevas (Scarlati, 1996). Los anticuerpos neutralizantes con una actividad amplia contra aislados primarios de VIH han sido detectados en pacientes no progresores de la enfermedad (Pilgrim, 1997). El isotipo del anticuerpo neutralizante es importante, ya que determina la activación del complemento y la concentración de éste es diferente en áreas críticas como lo son las membranas mucosas y varias secreciones corporales, los anticuerpos involucrados en la neutralización abarcan varios isotipos de inmunoglobulinas (Zolla Pazner, 1996).

4.2.4 *Mecanismos de neutralización.*

Los anticuerpos neutralizantes actúan evitando la unión del virus a la célula y de una manera postunión inhibiendo la penetración y desnudamiento del virus (Zolla Pazner, 1996). Los anticuerpos que inhiben la unión del virus a la célula enlazan a epitopos que sobrelapan al CD4bs e impiden la unión de esta región al CD4 mediante una inhibición estérica (Pognard y cols., 1996b). Esta región está localizada en la región conservada C4 de la gp120, por lo que la respuesta puede ser mantenida respecto a otros aislados virales (McKeating, 1995).

Los anticuerpos que actúan de una manera postunión no impiden la unión de la gp120 con el CD4, pero interfieren con eventos posteriores que pueden incluir enlazamiento al correceptor, fusión de membranas y/o entrada de la cápside. Dichos anticuerpos van dirigidos contra epitopos presentes en las regiones V1/V2, V3 de la gp120, el CD4i (región formada al unirse la gp120 al CD4) y contra gp41. Ciertos anticuerpos monoclonales contra la región V3 pueden neutralizar al

VIH únicamente en presencia de CD4 soluble, debido a que el epítipo de la región V3 es expuesto por la interacción gp120-CD4 y pueden actuar previniendo el corte proteolítico de la región V3 (Zolla-Pazner, 1996; Levy, 1998). El ectodominio de la gp41 también es un epítipo de neutralización y los anticuerpos dirigidos contra regiones en el ectodominio de esta glicoproteína pueden impedir la fusión de membranas y el desnudamiento del virus (Sattentau, 1996).

Los anticuerpos neutralizantes también pueden ocasionar una separación de la gp120 del virión (shedding) ocasionando una inactivación irreversible de la infectividad viral (Poignard y cols., 1996a). Al parecer, el anticuerpo desestabiliza algunas propiedades metastables de la envoltura que son necesarias para la entrada del virus a la célula (McDougal, 1996).

5. TRANSMISION VERTICAL DEL VIRUS.

La transmisión vertical del VIH, describe el paso del virus de la madre al producto, el cual puede ocurrir a tres niveles que son *in útero*, al momento del parto y de una manera postnatal. Existen diversos marcadores de transmisión vertical del VIH, entre los que destacan los que se muestran en la tabla 2 (Bryson, 1996).

Aspectos Virales	Carga viral elevada Fenotipo biológico del virus aislado de la madre
Aspectos inmunológicos	Bajo título de neutralización viral Bajo número de linfocitos T CD4+ Anticuerpos aumentadores de la infección Enfermedad clínica avanzada Infección primaria del virus
Aspectos maternos	Ruptura de membranas por más de 4 horas Eventos obstétricos Infecciones vaginales
Aspectos genéticos:	HLA

Tabla 2. Factores potenciales que influyen en la transmisión vertical del VIH (Bryson, 1996).

VIH únicamente en presencia de CD4 soluble, debido a que el epítipo de la región V3 es expuesto por la interacción gp120-CD4 y pueden actuar previniendo el corte proteolítico de la región V3 (Zolla-Pazner, 1996; Levy, 1998). El ectodominio de la gp41 también es un epítipo de neutralización y los anticuerpos dirigidos contra regiones en el ectodominio de esta glicoproteína pueden impedir la fusión de membranas y el desnudamiento del virus (Sattentau, 1996).

Los anticuerpos neutralizantes también pueden ocasionar una separación de la gp120 del virión (shedding) ocasionando una inactivación irreversible de la infectividad viral (Poignard y cols., 1996a). Al parecer, el anticuerpo desestabiliza algunas propiedades metastables de la envoltura que son necesarias para la entrada del virus a la célula (McDougal, 1996).

5. TRANSMISION VERTICAL DEL VIRUS.

La transmisión vertical del VIH, describe el paso del virus de la madre al producto, el cual puede ocurrir a tres niveles que son *in útero*, al momento del parto y de una manera postnatal. Existen diversos marcadores de transmisión vertical del VIH, entre los que destacan los que se muestran en la tabla 2 (Bryson, 1996).

Aspectos Virales	Carga viral elevada Fenotipo biológico del virus aislado de la madre
Aspectos inmunológicos	Bajo título de neutralización viral Bajo número de linfocitos T CD4+ Anticuerpos aumentadores de la infección Enfermedad clínica avanzada Infección primaria del virus
Aspectos maternos	Ruptura de membranas por más de 4 horas Eventos obstétricos Infecciones vaginales
Aspectos genéticos:	HLA

Tabla 2. Factores potenciales que influyen en la transmisión vertical del VIH (Bryson, 1996).

La transmisión *in útero* ha sido detectada por hibridación *in situ* en placenta, timo fetal y otros tejidos que se obtienen de abortos (Langston y cols., 1995); se ha aislado además virus infeccioso de líquido amniótico, tejidos fetales y de placenta. Los factores que pueden influir en este tipo de transmisión son entre otros: carga viral alta, bajo título de neutralización y bajo número de células CD4⁺ (Bryson, 1996).

La transmisión al momento del parto puede producirse cuando el recién nacido está expuesto a la sangre de la madre, a las secreciones cérvico-vaginales y a transfusiones sanguíneas materno-fetales (Bryson, 1996). El riesgo de infección aumenta con la exposición a la sangre materna, sobre todo en ruptura de membranas mayor a 4 horas (Landesman y cols., 1996).

La transmisión postparto se da específicamente mediante la lactancia ya que se ha detectado VIH libre en la leche materna y en las células productoras de leche, además de que pueden pasar células infectadas en la leche, sobre todo en el calostro (Toniolo y cols., 1995).

5.1 Aspectos virales implicados en la transmisión vertical.

Los virus maternos con una alta cinética de replicación y fenotipo IS han sido asociados con una mayor probabilidad de transmisión; sin embargo, la mayoría de los virus que se aíslan en el bebé son de fenotipo NIS. Aparentemente ambos virus pueden transmitirse, pero los NIS pueden realizar un escape inmunológico hacia los anticuerpos neutralizantes, además de que pueden infectar macrófagos placentarios (Fig. 5) (Scarlati, 1996; Levy, 1998).

5.2 Aspectos inmunológicos implicados en la transmisión vertical.

El sistema inmune de la madre puede ser un factor determinante en la transmisión vertical, ya que los anticuerpos neutralizantes atraviesan barrera placentaria (IgG), ocasionando una inmunización de tipo pasiva que puede impedir la infección del producto o en todo caso retardar los efectos de la infección (Devash y cols., 1990; Jenkins y cols., 1994; Goedert y Dublin, 1994; Ugen y cols., 1997). La respuesta inmune contra el VIH en los niños puede involucrar inicialmente

a los anticuerpos transmitidos por la madre, ya que se ha visto que el decremento de la carga viral en los niños ocurre antes de que se monte una respuesta citotóxica y que incluso puede llegar hasta una remisión de la infección; esto a diferencia de las personas adultas, en las que hay una aparición de anticuerpos neutralizantes después del decremento en la carga viral (D'Souza y Mathieson, 1996). Los anticuerpos neutralizantes pueden ser capaces de neutralizar al virus homólogo, por lo que puede conferirle protección al producto para que no se infecte; sin embargo, es incapaz de neutralizar nuevas variantes virales (Bryson, 1996), esto debido a la selección inmunológica por parte de anticuerpos que ocasionan la neutralización de variantes anteriores excluyendo a las variantes nuevas (Scarlati 1996). La presencia de anticuerpos aumentadores de la infección puede explicar los reportes de transmisión del virus de la madre al hijo en presencia de anticuerpos neutralizantes maternos (Levy, 1998).

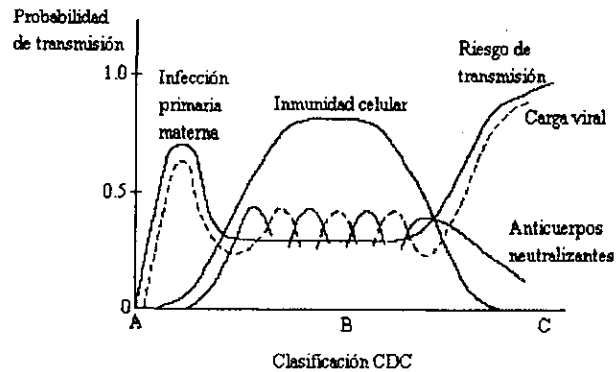


Figura 5: Modelo de transmisión vertical. Durante la etapa de latencia clínica puede haber periodos en los que exista neutralización viral con una disminución en la carga viral, y otros en los que estén presentes anticuerpos aumentadores de la infectividad con un aumento de la carga viral (Bryson, 1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La epidemia del VIH/SIDA representa un problema de salud pública importante a nivel mundial, ya que afecta a personas de ambos sexos en edad productiva y reproductora. Aún en la actualidad, no se han obtenido resultados que sean concluyentes en cuanto al mecanismo o los mecanismos por los cuales el virus se transmite de la madre al niño. La probabilidad media de que el virus se trasmita verticalmente es de un 30%, y disminuye a un 8% aproximadamente cuando se le administra AZT a la madre (Minkoff y Willoughby, 1995; Dickover y cols., 1996); el efecto del AZT podría reducir la carga viral materna o de manera profiláctica para el producto (Bryson, 1996). Sin embargo, existe un 70% de madres que no transmiten el virus y que no tienen tratamiento con AZT, razón por la cual es importante investigar los factores involucrados en la transmisión, para elucidar cuales serían los mecanismos que pueden prevenir ésta.

En el presente trabajo se estudió la actividad neutralizante de los anticuerpos IgG presentes en la madre como factor inmunológico humoral de la madre y el papel que podría jugar en la transmisión del virus, ya que los anticuerpos neutralizantes atraviesan la barrera placentaria ocasionando una inmunización pasiva en el producto.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta inmune humoral neutralizante materna al VIH y su correlación con la transmisión vertical del virus.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar ensayos de neutralización con sueros de mujeres embarazadas infectadas transmisoras y no transmisoras del virus a su hijo.
- Evaluar la actividad de anticuerpos neutralizantes VIH IIIb/LAV en línea celular MT2 mediante ensayos de neutralización determinados por observación de sincicios y cuantificación de antígeno p24 por el método de ELISA.
- Realizar una correlación entre los títulos de la neutralización de los sueros de las madres con la transmisión vertical del virus.

HIPÓTESIS

Si los anticuerpos neutralizantes maternos contra el VIH son capaces de reducir la infectividad y/o neutralizar al virus prototipo IIIb/LAV entonces suponemos que la probabilidad de que el producto se infecte se va a reducir significativamente.

METODOLOGÍA

MATERIAL Y REACTIVOS

- Campana de seguridad biológica
- Incubadora para cultivo celular (equipada con humedad, CO₂ al 5% y bajo condiciones de esterilidad)
- Tubos de centrifuga de 15 y 50 mL
- Centrifuga
- Frascos de cultivo de 25 cm² (F25) y 75 cm² (F75)
- Placas de cultivo de 96 pozos fondo plano
- Placas para ELISA de 96 pozos
- Pipetas desechables de 2, 5 y 10 mL
- Micropipetas de 20 y 200 µL
- Micropipeta multicanal de 50 a 200 µL
- Puntas amarillas
- Bata, guantes de látex desechables
- Buffer fosfato salino (PBS) estéril
- Microscopio, microscopio invertido
- Cámara de Neu Bauer

Reactivos:

- Ortofenilendiamina (OPD)
- Buffer de citofosfatos
- Buffer fosfato salino (PBS)
- Buffer de lisis
- Ácido clorhídrico 1N
- Colorante azul tripano (0.4%)

Material biológico:

- Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 de la cepa IIIb/Molt (VIH-1 IIIb/Molt)
- Línea celular MT2 (Tabla 4).
- Medio RPMI 1640 suplementado con 10% SBF
- Anticuerpos monoclonales anti- p24 (6C6 y 8G11) y conjugados (1G3, 5E1 y 1G10)
- Albúmina sérica bovina.
- Suero Bovino Fetal (SBF).

Las muestras evaluadas se dividieron en dos grupos; los plasmas maternos marcados como PXm fueron tomados después del parto, mientras que los plasmas marcados como UIRH -correspondientes a 4 mujeres- se tomaron durante el embarazo, como parte del proyecto "Prevención de transmisión materno-infantil del VIH por detección temprana y tratamiento con AZT y estudio de aspectos virológicos e inmunológicos en la transmisión", teniendo como Instituciones responsables a la UIRH y a CONASIDA de la Dirección General de Epidemiología; en la Tabla 3 se muestran los plasmas y la relación del tiempo de colección con el parto.

PLASMA MATERNO	FECHA DE COLECCIÓN
P452m	1 MES POSTPARTO
P460m	1 MES POSTPARTO
P461m	5 MESES POSTPARTO
P471m	7 MESES POSTPARTO
P472m	7 MESES POSTPARTO
P481m	9 MESES POSTPARTO
UIRH001 1	3 MESES DE EMBARAZO
UIRH001 2	8 MESES DE EMBARAZO
UIRH001 3	9 MESES DE EMBARAZO
UIRH002 1	6 MESES DE EMBARAZO
UIRH002 2	8 MESES DE EMBARAZO
UIRH002 3	9 MESES DE EMBARAZO
UIRH004 1	6 MESES DE EMBARAZO
UIRH004 2	7 MESES DE EMBARAZO
UIRH004 3	9 MESES DE EMBARAZO
UIRH005 1	6 MESES DE EMBARAZO
UIRH005 2	7 MESES DE EMBARAZO
UIRH005 3	8 MESES DE EMBARAZO

Tabla 3. Muestras de plasma de mujeres embarazadas infectadas por el VIH. La seriación de los plasmas de mujeres embarazadas se realizó con una separación mínima de un mes.

Línea celular MT2	Aislado viral HTLV IIIb/LAV
Línea celular Linfocítica	Aislado de laboratorio
ADN HTLV I	Altamente citopático (inductor de sincicios)
Formadora de sincicios	Replica rápidamente y a altos títulos de ag.
Expresa antígenos de superficie CD4 ⁺	Linfocitotrópico (PBMC's y líneas celulares T CD4 ⁺)

Tabla 4. Principales características de la línea celular MT2 y del aislado viral IIIb/LAV (Harada y cols., 1985).

MÉTODOS

Subcultivo de líneas celulares.

1. Examinar el cultivo celular en el microscopio invertido.
2. Para cuantificar las células, hacer una dilución 1:10 con azul tripano (10 μ L de la suspensión + 90 μ L de azul tripano). Se toman 10 μ L de la mezcla y se colocan en una cámara de Neu Bauer. Observar al microscopio.
3. Contar en los 4 cuadrantes superiores del hemocitómetro. Multiplicar el número de células contadas x la dilución x el factor de la cámara de Neu Bauer.
$$\# \text{ de células} \times 10 \times 2500 = \# \text{ de células/mL.}$$
4. De acuerdo al # de células contadas ajustar a una concentración de 250,000 células/mL.
5. Subcultivar 2 veces por semana o de acuerdo a los requerimientos de células de los experimentos.

Preparación de stock viral por infección aguda en la línea celular MT2.

1. Colocar en un frasco F75 2 x 10⁶ células IIIb/Molt resuspendidas en 15 mL. de medio RPMI 1640 + 10% de SBF.
2. Preparar una suspensión de células de la línea MT2 no infectadas en fase log. de crecimiento (2o. ó 3er. día después de subcultivar) en 10 mL de RPMI 1640 +10% de SBF a una [1x10⁶ células].
3. Juntar las células. Llevar a un volumen final de 30 mL de medio RPMI e Incubar a 37 °C, 5% CO₂, humedad.
4. Observar diariamente el cultivo para detectar la formación de sincicios.
5. Colectar el sobrenadante (SN) para los ensayos de Dosis Infecciosa 50 en Células T (TCID₅₀) y neutralización.
6. Clarificar el SN centrifugando a 2500 rpm durante 10 minutos.

Determinación de TCID₅₀

1. Se colocan en una placa de 96 pozos de fondo plano, 67 µL del SN viral + 133 µL de medio RPMI 1640 + 10% SBF en los pozos 1A a 5A. Mezclar bien.
2. Colocar 150 µL. de medio a los pozos desde 1B-5B hasta 1H-5H.
3. Tomar 50 µL. de la suspensión viral de los pozos 1A-5A y pasarlos a los pozos 1B-5B. Mezclar y pasarlos al 1C-5C, sucesivamente hasta el 1H-5H.
4. Montar un control de virus inactivado (56 °C, 20') con las mismas diluciones en la columna 6.
5. Adicionar 50 µL. de una suspensión celular MT2 a una concentración de $0.6 \times 10^6/\mu\text{L}$ (30×10^3 células./pozo). Alimentar primero los pozos del control de virus inactivado
6. Tapar la placa y observar al microscopio invertido para verificar que todos los pozos tengan células.
7. Incubar a 37 °C, 5% de CO₂, humedad.
8. Al día 1, retirar el SN, añadir 200 µL de medio RPMI 1640 + 10% SBF.
9. A partir del día 4 observar presencia de sincicios
10. Tomar 100 µL del SN de cada pozo y correr ELISA de ag. p24 del virus (ANEXO 1).
Determinar TCID₅₀ de acuerdo al método de Reed y Muench (ANEXO 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			4 ⁻¹			*						
B			4 ⁻²									
C			4 ⁻³									
D			4 ⁻⁴									
E			4 ⁻⁵									
F			4 ⁻⁶									
G			4 ⁻⁷									
H			4 ⁻⁸									

* Virus inactivado a las mismas diluciones

Ensayo de neutralización.

Preparación del suero.

1. Inactivar complemento colocando la muestra de suero materno en un baño María a 56 °C por 1 hora.
2. Diluir con medio RPMI 1640 1:10.
3. Filtrar por un poro de 0.22 µm

Preparación de la placa:

1. En una placa de 96 pozos. Colocar 100 µL. del suero diluido 1:10 en los pozos 1A-3A. Colocar 100 µL de medio en los pozos 1B-3B hasta 1G-3G.
2. Tomar 100 µL. de los pozos 1A-3A y pasarlos a los pozos 1B-3B, mezclar bien, tomar 100 µL y pasarlos a los pozos 1C-3C, así sucesivamente hasta la fila 1G-3G. Desechar los últimos 100 µL dilución: 1:40- 1:2560.
3. Tomar el sobrenadante fresco de la infección aguda y diluirlo con medio para obtener 100 Dosis Infeccivas 50 (DI₅₀)/100 µL. Colocar aproximadamente 100 DI₅₀/pozo.
4. Incubar la placa 60', 37 °C, humedad, 5% de CO₂
5. Adicionar las 30,000 células MT2/pozo resuspendidas en 40 µL de medio RPMI 1640.
6. Montar controles en la misma placa:
Suero humano negativo: Células + virus + suero negativo a VIH a las mismas diluciones
Células + virus inactivado (56 °C 1 hr.).
Virus: 100 DI₅₀ + células
7. Al día 1, retirar el SN, resuspender en 200 µL de medio (PBMC's con IL-2).
8. Determinar la neutralización al día 7 observando la presencia de sincicios ó colectando 100 µL del SN del ensayo para correr ELISA de ag. p24¹, realizar el cálculo del % de neutralización empleando la fórmula para cada dilución del suero.

¹ La presencia de sincicios indica una infección de las células, por lo que la inhibición de éstos es sinónimo de neutralización viral, una disminución en la producción de antígeno p24 comparado con el control de SH(-) indica también neutralización.

9. Graficar el % de neutralización contra la dilución del plasma problema.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							
1:40	muestra por triplicado			*	**							A							
1:80														B					
1:160														C					
1:320														D					
1:640																		E	
1:1280					&														F
1:2560																			G
																			H

- * Control de suero humano negativo a VIH a las mismas diluciones
- ** Control positivo: Virus + células.
- & Control de virus inactivado.

Cálculos:

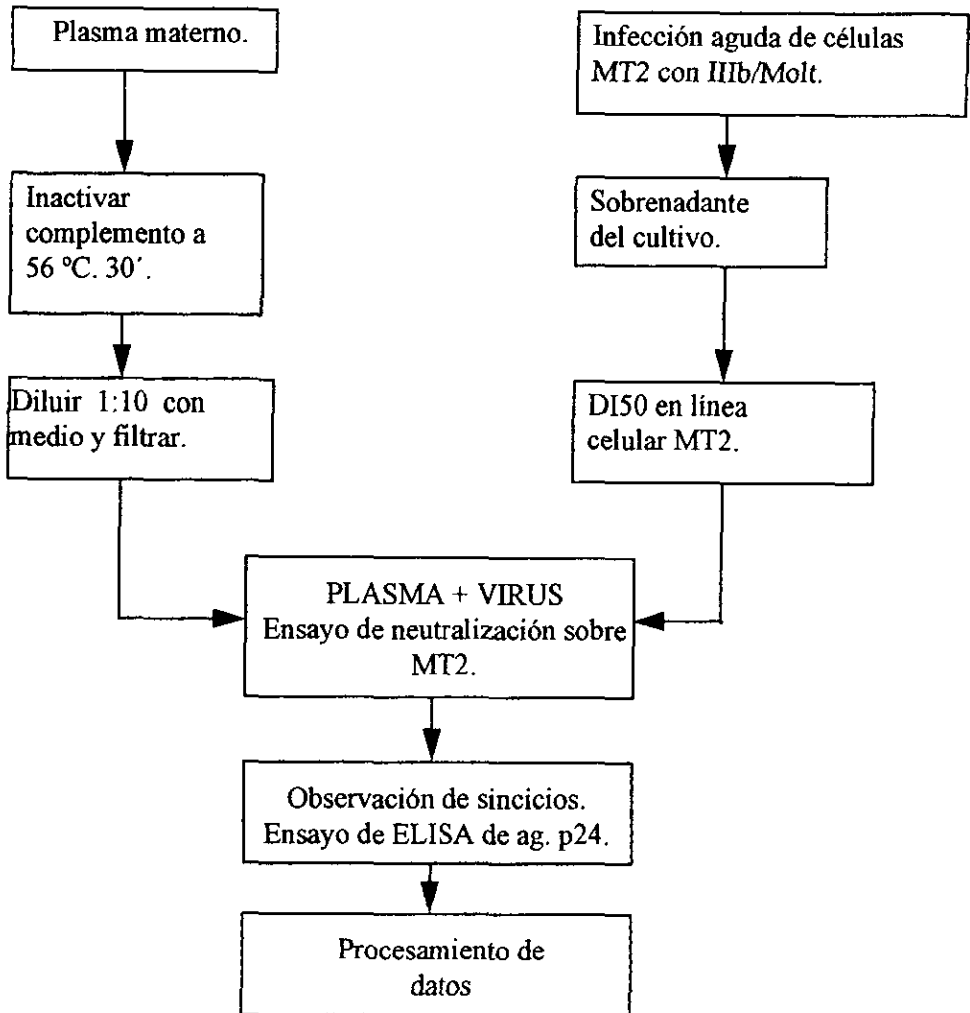
$$\% \text{ de Neutralización} = \frac{[p24]_c - [p24]_e}{[p24]_c} \times 100$$

[p24]: Concentración de ag. p24

e : Experimental

c : Control de células + virus
+ suero negativo a VIH.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

1. Cultivo de células MT2.

Se cultivaron células MT2 a diferentes concentraciones (10×10^4 a 75×10^4 células) en placas de cultivo de 96 pozos fondo plano para conocer la cantidad de células óptimas para los ensayos de neutralización y de $TCID_{50}$ (Dosis infecciosa 50 en células T). El criterio que se usó para la selección de esta cantidad fueron la viabilidad y el crecimiento celular que se obtuvo a los 7 días de cultivo. En la figura 6 se muestra que cuando la cantidad inicial de células era de 3×10^4 , había un mayor crecimiento celular; por lo que se eligió esta cantidad para emplearse en los ensayos de $TCID_{50}$ y neutralización. Además se observó que la viabilidad a esta concentración de células fue del 84% y que disminuía conforme la cantidad inicial de células era mayor.

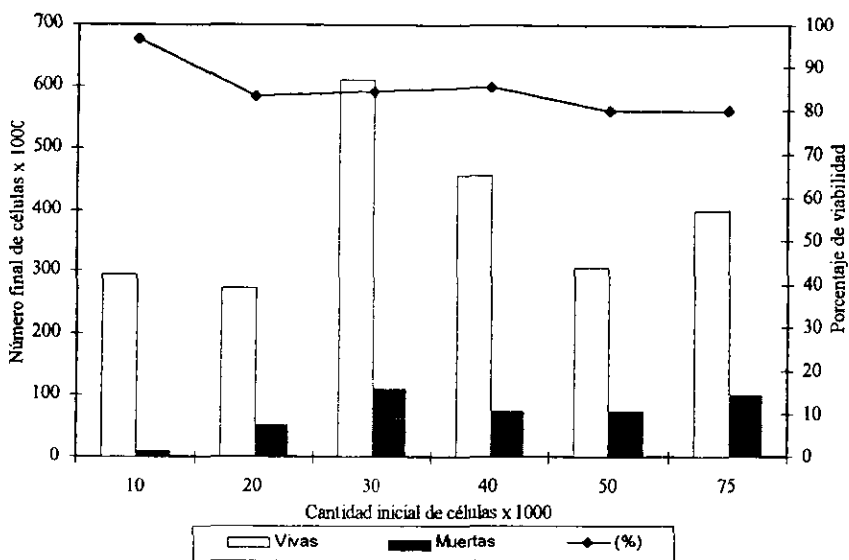


Figura 6. Cultivo de células MT2. Las células en diferentes cantidades se cultivaron en 200 μ L de medio RPMI 1640, 10% de suero bovino fetal, a 37°C, atmósfera de 5% de CO_2 y humedad.

2. Obtención de las TCID₅₀ a diferentes días de la infección aguda.

Se realizó una infección aguda empleando 2×10^6 células IIIb/Molt y 10×10^6 células MT2 en medio de cultivo RPMI 1640-10% SBF. Se colectó el SN a los días 1, 2 y 3 de infección y con éstos se realizó un ensayo de TCID₅₀ empleando células MT2. La TCID₅₀ se determinó mediante observación de sincicios a los 7 días de realizado el ensayo. En la figura 7 se muestra que el día 2 de la infección aguda es óptimo para la colección del SN y obtención de un stock viral. Este tiempo de infección fue el que se empleó para obtener virus para los ensayos de neutralización.

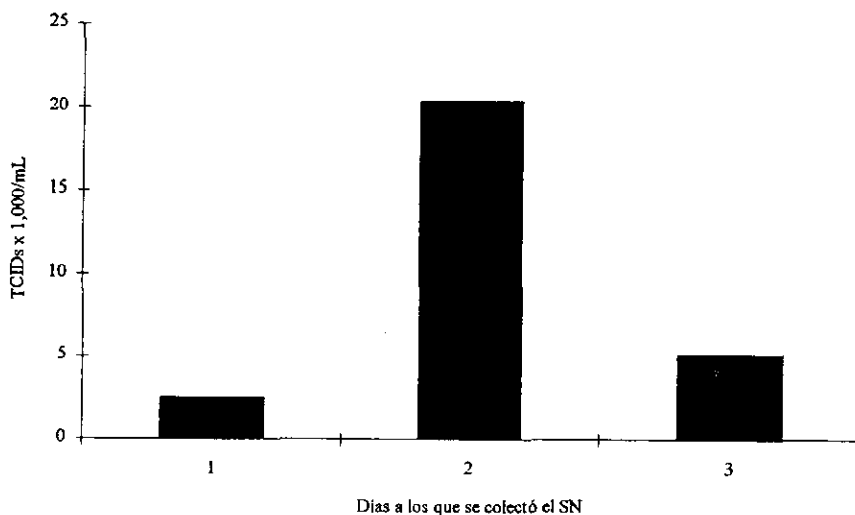


Figura 7. TCID₅₀ observadas a diferentes días de la infección aguda empleando células MT2. Las dosis infectivas se calcularon mediante el método de Reed y Muench (ANEXO 1).

3. Ensayos de neutralización del virus prototipo IIIb/Molt.

Se colectó el SN al segundo día de la infección aguda empleando células MT2, y se diluyó con medio RPMI para obtener aproximadamente 100 DI₅₀/100µL. A su vez, se realizaron ensayos de TCID₅₀ en paralelo para determinar las DI₅₀ reales empleadas en los ensayos de neutralización. A los 7 días se leyó la placa al microscopio invertido tanto para el título de neutralización como

para la TCID₅₀ mediante la observación de sincicios, para la cuantificación de ag. p24 por ELISA, se colectó el SN del cultivo.

En la tabla 4 se indican los resultados que se obtuvieron por observación de sincicios, así como las dosis infectivas virales que se emplearon en cada ensayo; de las diez plasmas que se valoraron, cinco plasmas no neutralizaron al virus, tres tuvieron un título de neutralización de 160 y dos de 80.

Por otro lado, los resultados de neutralización de las 18 muestras (incluyendo las muestras seriadas) empleando ELISA de ag. p24 se muestran en las figuras 8 y 9. Las gráficas se obtuvieron del cálculo del por ciento de neutralización como se indica en la metodología, el por ciento de neutralización se obtuvo para cada dilución y se graficó contra la dilución del plasma evaluado.

Los plasmas P452m, P471m y P481m se valoraron con 111 DI₅₀ del virus IIIb; de éstas, las muestras P452m y P471m mostraron un efecto de aumento de la infectividad viral a diluciones mayores del plasma materno (1:2560 y 1:640 respectivamente), mientras que en la muestra P481m se observó este comportamiento en todas las diluciones del plasma evaluadas. La muestra P452m encontrada como no neutralizante por el ensayo de sincicios, presenta un efecto neutralizante hasta la dilución 1:1280. Finalmente, la muestra P471m presenta un resultado neutralizante hasta la dilución 1:160 por ambos ensayos, aunque puede observarse por el ensayo de p24 que a mayores diluciones del plasma se presenta un fenómeno de aumento de la infectividad (figura 8A).

Los plasmas P460m, P461m y P472m se evaluaron con una dosis viral muy elevada de 640 DI₅₀. Los resultados obtenidos con estas muestras por ELISA, concuerdan con los reportados mediante observación por sincicios. Los plasmas P461m y P472m no neutralizaron al virus IIIb mientras que la muestra P460m tuvo un efecto neutralizante hasta una dilución de 1:160 por observación de sincicios, mientras que por ELISA este título disminuyó a una dilución de 1:80; a diluciones mayores, este plasma mostró un efecto mínimo de aumento de la infectividad viral (Figura 8B).

En las figuras 9 A-D, se muestran las curvas de neutralización con muestras seriadas de las mujeres embarazadas: UIRH001, UIRH002, UIRH004 y UIRH005. El propósito de realizar ensayos de neutralización con estas muestras fue observar si la actividad neutralizante del plasma se mantenía a través del tiempo de gestación.

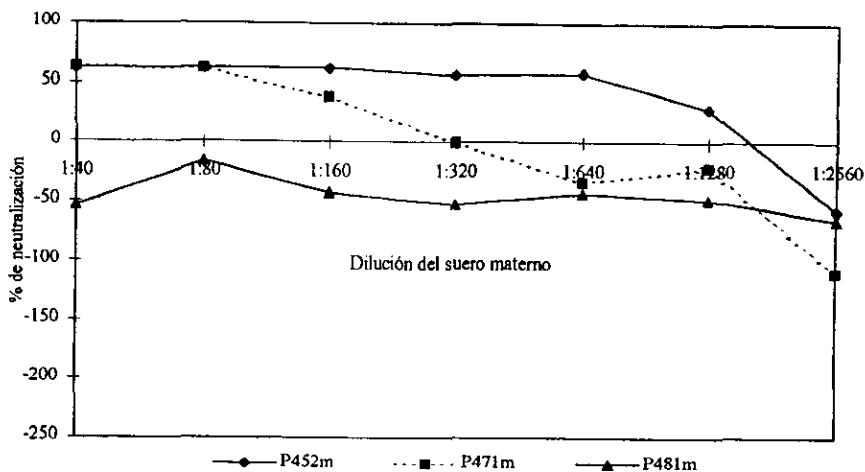
Plasma	Título de neutralización	Dosis infectiva
P471m	160	83.2
UIRH001 2	160	83.2
UIRH004 1	80	83.2
UIRH005 1	No neutraliza	83.2
P461m	No neutraliza	83.2
P472m	No neutraliza	83.2
P460m	160	204.0
P452m	No neutraliza	204.0
UIRH002 1	80	102
P481m	No neutraliza	102

Tabla 4. Neutralización de virus IIIb con muestras de plasma materno determinado mediante observación de sincicios. El título de neutralización es el recíproco de la última dilución a la que el anticuerpo inhibe la formación de sincicios.

Los plasmas UIRH001 se evaluaron con 62 DI_{50} , la primera muestra presenta un aumento considerable de la infectividad viral, mientras que las muestras 2 y 3 tuvieron un efecto de neutralización hasta una dilución 1:320 (Figura 9A). Los plasmas seriados de UIRH002 se evaluaron con 156 DI_{50} , los resultados mostraron un patrón de neutralización parecido en las tres muestras con una actividad de aumento de la infectividad de la primer muestra seriada a una dilución del plasma de 1:640 que podría ser un error experimental (Figura 9B).

Los plasmas seriados de UIRH004 se evaluaron empleando 151 DI_{50} . En la figura 9C se muestra una neutralización sostenida y un comportamiento de las curvas parecido a través de todas las diluciones en las tres muestras. Los plasmas maternos seriados UIRH005 se evaluaron con 240 DI_{50} ; las curvas muestran un comportamiento parecido al de las muestras seriadas anteriores. Este comportamiento de neutralización se mantiene hasta la dilución de 1:1280 y en la dilución de 1:2560, se observa un ligero fenómeno de aumento de la infectividad en las tres muestras (figura 9D).

A. GRÁFICA 1. CURVAS DE NEUTRALIZACIÓN DE PLASMAS MATERNOS.



B. GRÁFICA 2. CURVAS DE NEUTRALIZACIÓN DE PLASMAS MATERNOS.

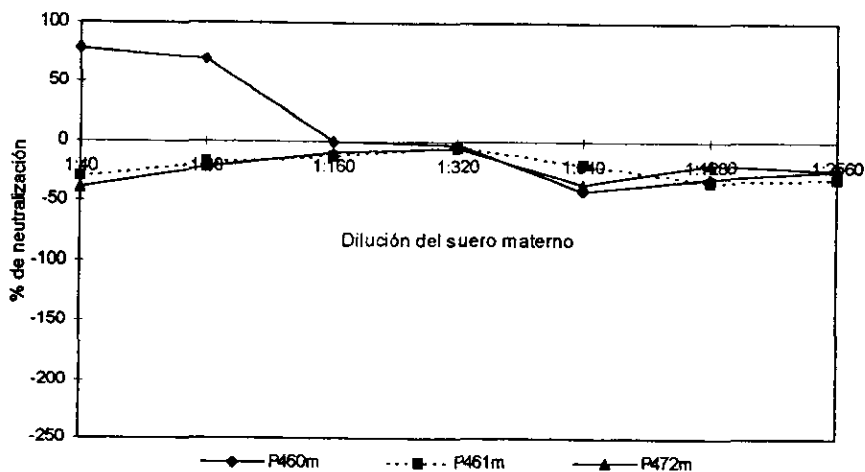
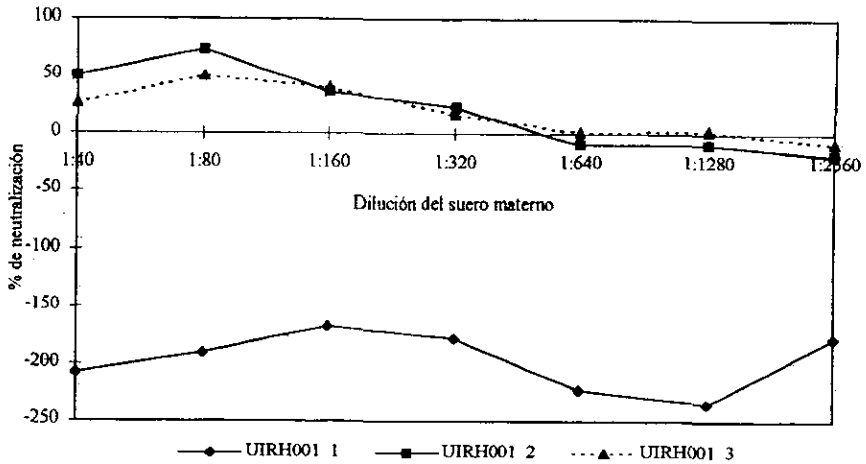


Figura 8. Neutralización del virus IIIb por plasmas maternos. A) Plasmas evaluados empleando 111 DI_{50} . B) Plasmas evaluados empleando 640 DI_{50} . El cálculo del porcentaje de neutralización se realizó empleando un control de plasma humano negativo, a las mismas diluciones que las muestras problema.

A. GRÁFICA 3. CURVAS DE NEUTRALIZACIÓN DE PLASMAS SERIADOS MUESTRAS UIRH001.



B. GRÁFICA 4. CURVAS DE NEUTRALIZACIÓN DE PLASMAS SERIADOS MUESTRAS UIRH002.

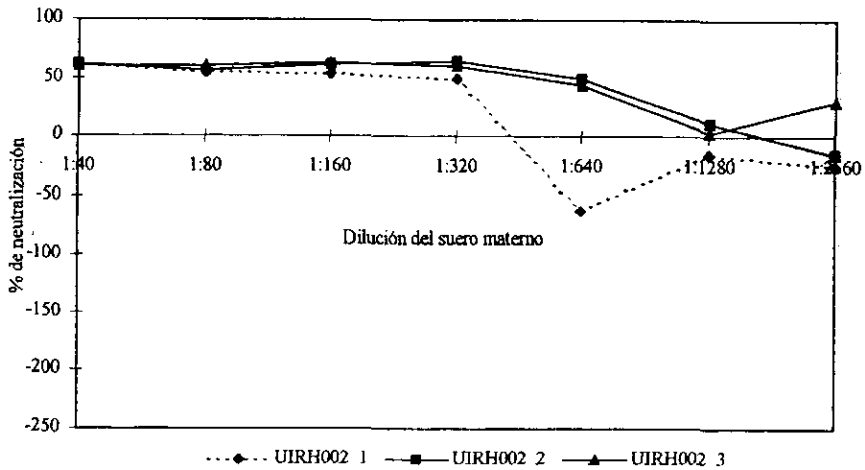
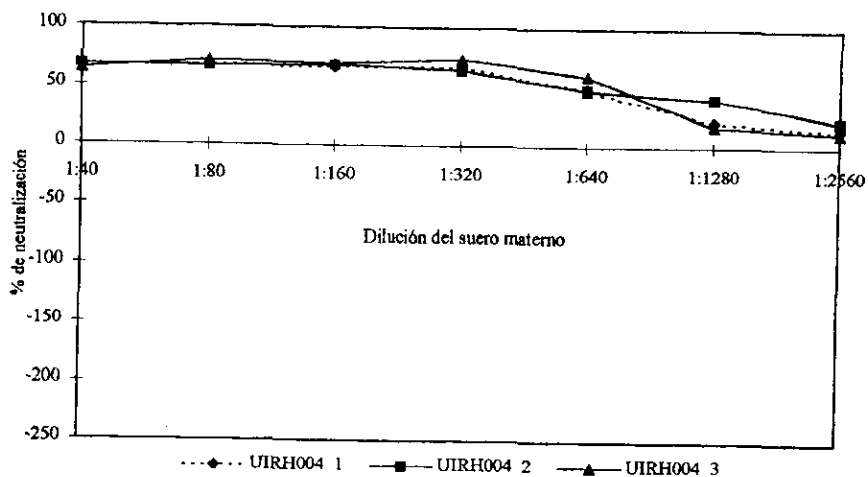


Figura 9. Neutralización del virus IIIb por muestras seriadas de plasmas maternos correspondientes al último trimestre del embarazo. A) Plasmas evaluados empleando 62 DI_{50} . B) Plasma evaluados empleando 156 DI_{50} .

C. GRÁFICA 5. CURVAS DE NEUTRALIZACIÓN DE PLASMAS SERIADOS MUESTRAS UIRH004



D GRÁFICA 6. CURVAS DE NEUTRALIZACIÓN DE PLASMAS SERIADOS MUESTRAS UIRH005

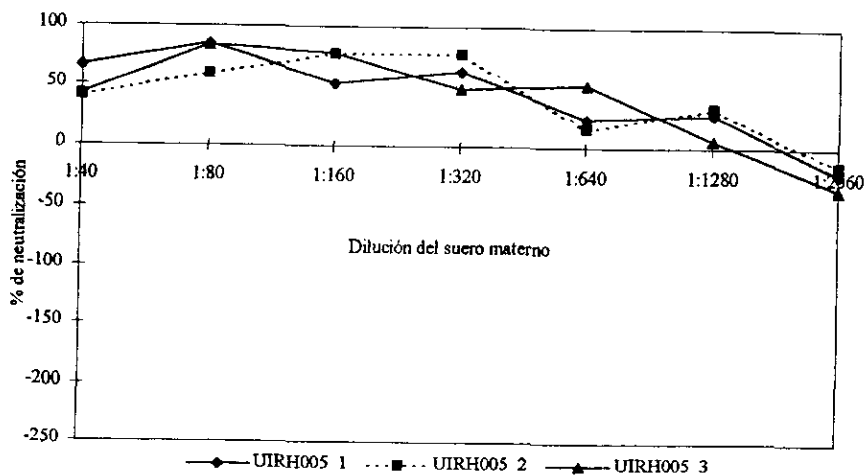


Figura 9. Continuación. Neutralización del virus IIIb por muestras seriadas de plasmas maternos correspondientes al último trimestre del embarazo. C) Plasmas evaluados empleando 151 DI₅₀. D) Plasmas evaluados empleando 240 DI₅₀.

4. Cálculo del área bajo la curva de los ensayos de neutralización.

Para obtener resultados que describieran el comportamiento de neutralización y aumento de los plasmas maternos a lo largo de todas las diluciones evaluadas, se realizó el cálculo del área bajo la curva de dichos ensayos. Los valores positivos indican un efecto predominante de neutralización, mientras que los valores negativos indican un efecto predominante de aumento de la infectividad viral. En las curvas en las que se observaron los dos fenómenos de neutralización y de aumento, se restaron los valores de aumento de la infectividad viral a los valores de neutralización; el signo del valor del área representa el efecto predominante. En la tabla 6 se observa que las muestras P452m, P460m y P471m con un efecto mixto de aumento/neutralización, presentan un área bajo la curva positiva, demostrando un efecto general de neutralización; mientras que las muestras P461m, P472m y P481m presentan un efecto de aumento de la infectividad viral y un área bajo la curva negativa.

Plasma materno	Área bajo la curva	DI ₅₀	Transmisión
P452m	272.0	111	No
P460m	20.0	630	Si
P461m	-117.0	630	No
P471m	23.8	111	Si
P472m	-123.8	630	No
P481m	-261.3	111	No
UIRH001 1	-1185.6		
UIRH001 2	128.7	62	No
UIRH001 3	121.9		
UIRH002 1	100.7		
UIRH002 2	267.2	156	No
UIRH002 3	277.2		
UIRH004 1	312.4		
UIRH004 2	330.2	151	No
UIRH004 3	329.5		
UIRH005 1	273.9		
UIRH005 2	278.0	240	No
UIRH005 3	272.6		

Tabla 6. Áreas bajo la curva de los ensayos de neutralización. Los valores positivos representan una neutralización viral y los valores negativos un aumento en la infectividad del virus. Se indica además si la madre transmitió el virus al niño.

Por otro lado, los plasmas seriados UIRH002, UIRH004 y UIRH005 muestran áreas bajo la curva parecidos, lo cual podría explicarse porque la diferencia de tiempo entre cada muestra de plasma materno fue máximo dos meses. Las de UIRH001 presentan una mayor diferencia lo cual se atribuye a que el tiempo entre ambas muestras fue de 5 meses.

5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de estos ensayos, se realizó mediante una prueba de independencia empleando un estimador χ^2 y se probó la hipótesis de que la transmisión era o no independiente de la capacidad neutralizante del plasma materno.

H_0 : Existe una independencia entre la actividad neutralizante del plasma materno con respecto a la transmisión del virus al niño.

H_1 : La transmisión del virus depende de la actividad neutralizante del plasma materno.

	AUMENTO	NEUTRALIZACIÓN	TOTAL
SI TRASMITE	0	2	2
NO TRASMITE	3	5	8
TOTAL	3	7	10

Tabla de contingencia 2 x 2.

Empleando la χ^2 , se realizó una prueba de independencia de las variables, con los siguientes resultados.

La χ^2 calculada:

$$\chi^2_y = \frac{10(-6 \times 10/2)^2}{(2)(8)(3)(7)} = 3.6 \quad \text{Ecuación modificada de Yates (Marques 1991).}$$

χ^2 de tablas:

$$g. l. = (2-1)(2-1) = 1 \quad \alpha = 0.1$$

$$\chi^2_{\text{teórica}} = 2.7$$

$$\chi^2_y > \chi^2_{\text{teórica}}$$

La ji-cuadrada calculada es mayor que la teórica, por tanto se rechaza la hipótesis nula, se concluye que si existe una dependencia entre la neutralización del plasma materno y la transmisión del virus.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Cultivo de células MT2.

El propósito de realizar los cultivos celulares en placas de 96 pozos fue conocer la cantidad óptima de células para los ensayos de neutralización y TCID₅₀. Se observó que cuando la densidad celular era mínima (20×10^3 cels./200 μ L ó menos), el contacto célula-célula necesario para la infección y formación de sincicios resultaba muy pobre, mientras que cuando la concentración era mayor (50×10^3 cels./200 μ L o más), este contacto contribuía al detrimento de la viabilidad celular como se muestra en la figura 6. El crecimiento celular fue óptimo cuando se emplearon 30×10^3 células, lo cual es lógico debido a que a una población mayor de células los nutrimentos necesarios para el crecimiento celular disminuyen más rápido y en consecuencia este crecimiento no es tan alto. Cuando la cantidad de células es menor, éstas no tienen un rápido crecimiento aunque su viabilidad sea aceptable. En base a esto, se eligió la cantidad de 30×10^3 células como la óptima para los ensayos de TCID₅₀ y neutralización, lo cual coincide con el número de células empleadas en los métodos estandarizados por el personal de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos (35,000 células).

2. Obtención de las TCID₅₀ a diferentes días de la infección aguda.

La infección aguda se realizó para obtener una mayor cantidad de partículas infecciosas, ya que las partículas no infecciosas presentes en un SN de cultivo viral pueden enlazar a anticuerpos o a receptores CD4 de la célula blanco durante la realización del ensayo de neutralización; es por ello que se empleó un SN fresco que aseguraba una concentración viral necesaria y un rango mayor de partícula infecciosa : partícula no infecciosa (PI : PNI) para dichos ensayos.

En la infección aguda se emplearon las células en un radio de 1 célula infectada : 5 células no infectadas, para garantizar un contacto óptimo de las células no infectadas con las infectadas en la formación de los sincicios. Antes de realizar los ensayos de neutralización fue necesario conocer las DI_{50} que se obtenían de una infección aguda; para ello se realizaron ensayos de $TCID_{50}$ con el SN recuperado de cada día de esta infección hasta el día 3.

Al realizar los ensayos de $TCID_{50}$ del SN de la infección aguda sobre células MT2, se determinó que tanto al primer día como al tercero, las DI_{50} que se produjeron fueron bajas para la obtención de un *stock* viral; mientras que la mayor infectividad se obtuvo al segundo día. Esto es explicable ya que al primer día aunque se observaron sincicios, la cantidad de viriones liberados pudo ser muy baja; mientras que al tercer día se observaron muchos detritos celulares y el medio de cultivo tuvo una coloración amarillenta debido al pH ácido del medio, lo cual disminuyó la infectividad del virus; además de que el virus libre disminuye su infectividad a través del tiempo (Karn 1995).

Debido a que el radio de PI : PNI, puede variar de un *stock* viral a otro, se realizó un ensayo de $TCID_{50}$ paralelo a cada ensayo de neutralización para conocer las DI_{50} empleadas. Como se observa, entre cada ensayo de neutralización hubo variaciones en las DI_{50} , que puede deberse a que existe una variación en la producción de virus infeccioso en el sistema aún cuando se estandarizaron los ensayos.

3. Ensayos de neutralización.

Los ensayos de neutralización abarcan dos tipos de metodología, en una la concentración del anticuerpo no se modifica y se realizan diluciones del *stock* viral, en la otra se mantiene constante el número de DI_{50} y se diluye el anticuerpo que se está valorando. Para fines prácticos, la segunda metodología es de elección, debido a que el volumen de plasma empleado puede ser muy limitado, en cambio la producción de *stocks* virales se limita únicamente a los materiales biológicos y a los reactivos disponibles en el laboratorio. El método de detección de los resultados

también varía ya que se puede detectar de una manera cualitativa mediante observación de sincicios si el tipo de células es el adecuado para determinarlo o de una manera cuantitativa mediante ELISA de captura de ag p24.

El reporte de un título de neutralización ofrece una información pobre acerca del comportamiento de neutralización y aumento de la infectividad por el plasma a través de todas las diluciones evaluadas; además, la determinación de este título es muy subjetivo, ya que depende de la comparación visual de los sincicios que pueden ser muy heterogéneos en su tamaño y forma, lo que puede dificultar la determinación de los resultados. Por estas razones, los ensayos de TCID₅₀ y neutralización se corroboraron mediante un ELISA de captura cuantificándoles ag. p24, y con esto se obtuvieron resultados mas precisos en cuanto a la cantidad de las DI₅₀'s empleadas así como una mayor información con respecto al comportamiento del anticuerpo a través de todas las diluciones del plasma.

Como se observa en la tabla 4, por observación de sincicios la mitad de los plasmas neutralizan al virus con títulos de 80-160 y la otra mitad no neutralizó al virus IIIb. Estos resultados son concordantes con los obtenidos con los ensayos determinados por ag. p24, excepto en la muestra UIRH005 que es no neutralizante por sincicios y que en los ensayos determinados por ELISA se obtuvo neutralización en las tres muestras seriadas.

En el caso de las muestras P452m y P460m se emplearon dosis de virus diferentes en los ensayos por observación de sincicios de los determinados por ag. p24. La muestra P452m, no neutralizó 204 DI₅₀ por sincicios; sin embargo, en el ensayos realizado con 111 DI₅₀ y determinados por ag. p24 se observa una neutralización en todas las diluciones de plasma evaluadas (hasta 1:2560). En la muestra P460m se obtuvo un título de 160 en el ensayo por sincicios empleando 204 DI₅₀, mientras que cuando se emplearon 640 DI₅₀ y determinados por ag. p24, el máximo título fue de 80. Otro ensayo (no mostrado) en el que se emplearon 102 DI₅₀ mostró un título de 320. Estos resultados corroboran que a mayor dosis viral se requiere una mayor cantidad de anticuerpos para neutralizarla y por lo tanto observamos una disminución en el título de neutralización.

Las muestras P481m y UIRH002 se valoraron empleando 102 DI_{50} en el ensayo de neutralización determinado por sincicios. El resultado no neutralizante de la muestra P481m concuerda con el obtenido en el ELISA de ag. p24, en el que se obtuvo un efecto de aumento de la infectividad viral a todas las diluciones. La muestra UIRH002 tuvo un título de 80, mientras que en el ELISA de ag. p24, se detectó una neutralización mayor al 50% hasta una dilución de 1:320.

Para las muestras P452m, P471m y P481m (fig. 8 A), se observó un efecto de aumento de la infectividad a altas diluciones. Los valores de aumento que se indican en la última dilución de los plasmas problema son diferentes; si estos porcentajes fueran parecidos podría pensarse que se presentó un error en los controles y que el cálculo del por ciento de neutralización fue incorrecto. Los resultados de las muestras coinciden con lo reportado anteriormente por observación de sincicios.

Para las muestras P460m, P461m y P472m se utilizó una mayor cantidad de virus; sin embargo, esto no tuvo una marcada influencia en los resultados que se obtuvieron ya que a las muestras P461m y P472m, se les había reportado anteriormente como no neutralizantes mediante observación de sincicios empleando 82 DI_{50} . Al emplear 640 DI_{50} se obtuvo un efecto de aumento bajo de la infectividad en estas dos muestras y refleja datos reproducibles en la realización de este ensayo (Fig. 8B).

La mayoría de los plasmas seriados muestra un efecto de neutralización muy parecido, que podría deberse a que son muestras con una separación máximo 2 meses entre cada una de ellas; razón por la cual no hay cambios con respecto a la respuesta inmune humoral y esta se mantiene.

Para la muestra seriada UIRH001, se observó una neutralización baja en las muestras seriadas 2 y 3 y un aumento de la infectividad en la muestra 1 empleando 62 DI_{50} . Entre la primera muestra y la segunda hay una separación de 5 meses, lo cual podría explicar por qué en la primera existe un efecto aumentador de la infectividad viral, mientras que en la segunda y tercer muestra este efecto sea de neutralización (Fig. 9A). Estos resultados concuerdan con el modelo propuesto

por Bryson en 1996, en el que se explica que a través del tiempo pueden variar los efectos de neutralización y aumento. Con la muestra 1 se observó un fenómeno interesante. Cuando se emplearon 62 DI_{50} , el aumento de la infectividad viral fue muy alto (-1185); mientras que cuando se emplearon un mayor número de DI_{50} (535 DI_{50}), el aumento de la infectividad fue mas bajo (-348, datos no mostrados), lo que concuerda con otros resultados obtenidos en el laboratorio (Laura Adalid, comunicación personal). Estos resultados indican que en presencia de anticuerpos aumentadores de la infectividad y a un menor número de DI_{50} se podría potencializar una mayor replicación viral, lo que resulta de gran interés ya que es un fenómeno que no se ha estudiado.

En la muestra UIRH002 1 hay un aumento muy marcado en la infectividad del virus a una dilución de 1:640, que podría deberse a un error experimental en este punto (Fig. 9B). Aún con estos antecedentes, se tomó en cuenta para el cálculo del área bajo la curva, el cual muestra una disminución en el valor del área, que no es tan marcada ya que indica la predominancia de un efecto neutralizante como se puede observar en la tabla 4.

Los plasmas seriados de UIRH004, tuvieron un comportamiento de neutralización sostenido a lo largo de todas las diluciones; hasta una dilución de 1:640 se observó una neutralización arriba del 50%, disminuyendo en las diluciones siguientes. En las últimas diluciones existe una neutralización mínima que sin embargo es importante ya que de todas las muestras maternas evaluadas es la que tiene un mayor porcentaje de neutralización a altas diluciones (Fig. 9C).

En los plasmas seriados de UIRH005, la curva muestra una mayor neutralización a una dilución posterior a la inicial, lo cual no puede atribuirse a un error técnico, debido a que este comportamiento está presente en las tres muestras. Se observa que el comportamiento de las curvas es constante en las tres muestras y puede ser debido a que la separación entre estas tres sea de un mes (Fig. 9D).

Por otro lado, como los ensayos de neutralización para las muestras se realizaron a diferentes dosis infectivas, deben tomarse en cuenta los siguientes puntos para poder considerar a los resultados como reproducibles:

- A un número mayor de DI_{50} empleadas, el título y por ciento de neutralización disminuye. La diferencia en el número de DI_{50} tiene un efecto diferente cuando se presenta un aumento de la infectividad el cual requiere un mayor estudio y análisis. Así, para los fines de este estudio, los resultados que se obtienen a diferentes DI_{50} son reproducibles debido a que los plasmas que no neutralizan lo hacen tanto a altas como a bajas DI_{50} , mientras que los plasmas que tienen un cierto efecto neutralizante disminuyen su título y por ciento de neutralización. Las DI_{50} empleadas no son tan altas como para ocasionar una infección aguda de las células MT2, ya que esto podría ocasionar que no se observara ningún efecto de neutralización.
- Las DI_{50} no se pueden comparar entre las determinadas por sincicios y las determinadas por ELISA de ag. p24, ya que el método de ELISA es más preciso y se pueden detectar por esta metodología SN positivos que no se detectan mediante observación de sincicios.
- Del mismo modo, no se pueden comparar los resultados de neutralización que se obtienen de la observación de sincicios y mediante el ELISA de captura; sin embargo, se puede observar una concordancia en el comportamiento de neutralización entre estas metodologías. Para el análisis estadístico se usaron los datos de neutralización determinados mediante ELISA de ag. p24, ya que estos son más representativos de lo que ocurre en todas las diluciones del plasma.

4. Neutralización y transmisión vertical.

De las poblaciones infectadas por el VIH/SIDA, el modelo de transmisión materno-infantil ha sido el de mayor interés, ya que la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra las *glicoproteínas de envoltura del virus podrían evitar la infección por el virus o en su caso retardar los efectos de éste en el infante debido a que atraviesan barrera placentaria*. Esto es visible ya que

la probabilidad de transmisión es baja (alrededor de 0.30) y el periodo de latencia puede ser corto o largo, lo cual indica que la respuesta inmune humoral podría estar jugando un papel importante en la transmisión vertical.

La investigación acerca del papel que pueden jugar los anticuerpos neutralizantes en prevenir la transmisión vertical ha sido vasta; por un lado, se ha correlacionado la afinidad de anticuerpos contra péptidos presentes en regiones de gp120 y gp41 y la transmisión vertical (Devash y cols., 1990; Rubinstein y cols. 1993; Schreiber y cols., 1997; Ugen y cols., 1997); mientras que otras investigaciones no consideran esta respuesta como protectora (Halsey y cols., 1992; Goedert y Dublin 1994; Mabondzo y cols., 1995). Por otro lado, se ha resaltado la respuesta de anticuerpos contra virus homólogo como protectora (Scarlati, 1996; Jansson, 1997) mientras que en otras investigaciones realizadas no se ha encontrado tal asociación (Bal y cols., 1996). Es por ello que aún en la actualidad existe controversia acerca de la capacidad protectora de los anticuerpos neutralizantes, por lo que se debe profundizar aún más el estudio en estos tópicos.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar si existe una asociación entre la transmisión vertical y la respuesta inmune humoral. El número de plasmas empleados fue bajo, y la prueba estadística muestra una asociación entre estas dos variables hasta un nivel de significancia de $\alpha = 0.1$.

Con fines de analizar los resultados obtenidos debemos separar las muestras estudiadas en dos grupos; aquellas que fueron colectadas durante el embarazo -muestras UIRH- y las que corresponden a tiempos posteriores al nacimiento del bebé. Las cuatro mujeres codificadas como UIRH recibieron tratamiento con AZT durante su embarazo y ninguna de ellas transmitió el virus a su bebé. De los 12 ensayos realizados en muestras secuenciales (3 muestras por paciente) sólo en un caso se observó un fenómeno de aumento de la infectividad correspondiente a la UIRH001 a los 3 meses de embarazo, mientras que en todos los otros casos se obtuvo un área bajo la curva positiva (rango 100-330) que indica neutralización.

En el otro grupo de seis mujeres muestreadas entre 1 y 9 meses postparto, dos de ellas si transmitieron el virus a sus bebés, en ambos casos el área bajo la curva indican que sus anticuerpos no tienen básicamente ningún efecto global sobre el virus (área \pm 20), presentando un efecto mixto de neutralización y aumento. El resultado de aumento de la infectividad observado en los plasmas P481m, P461m y P472 sin existir transmisión al bebé podría indicar que no existe correlación entre la actividad de los anticuerpos maternos y la transmisión más sin embargo, hay que considerar que en los tres casos mencionados la muestra materna fue tomada por lo menos 5 meses postparto, lo cual nos hace dudar de la actividad de dichos anticuerpos durante el embarazo y parto de dichas mujeres.

En este estudio, las madres que tienen un comportamiento mixto de neutralización y aumento transmitieron el virus a sus hijos; los anticuerpos aumentadores se hacen evidentes a medida que aumenta la dilución del plasma empleado, lo cual de acuerdo con Levy (1998) podría explicar por qué ocurre la transmisión vertical en presencia de anticuerpos neutralizantes maternos.

CONCLUSIONES

- La transmisión vertical del VIH depende de varios factores tanto inmunológicos como virales, esta transmisión se puede correlacionar con el *status* inmunológico de la madre, pero debido a la dependencia multifactorial, es muy aventurado decir que la no transmisión del virus dependa únicamente de la respuesta neutralizante del plasma materno; es por ello que los resultados reportados en la literatura son muy contradictorios respecto a la correlación que existe entre la transmisión vertical del virus y el efecto neutralizante del plasma materno. En el presente estudio, se determinó que existe una asociación entre la no transmisión del virus y el fenómeno de neutralización; sin embargo, como se dijo anteriormente, no se puede asegurar que la neutralización sea efectiva para prevenir la transmisión del virus.
- Durante todo el embarazo se pueden presentar etapas de neutralización y otras en las que exista un fenómeno de aumento de la infectividad viral, lo cual concuerda con el modelo propuesto por Bryson en 1996, en este modelo se explica que durante el periodo de latencia de la enfermedad pueden existir etapas de neutralización y de aumento de la infectividad viral .
- El tratamiento con AZT disminuye la carga viral y podría tener un efecto potencializador del aumento de la infectividad viral como se observa en la muestra UIRH001 1, ya que a menor número de DI_{50} empleadas es mayor este efecto, lo cual podría tener consecuencias en la transmisión del virus.

PROPUESTAS

- Los ensayos de neutralización se realizaron con un aislado viral heterólogo linfocitotrópico; sin embargo, se ha visto que los virus que se aíslan de los bebés pueden ser monocitotrópicos, por lo cual convendría realizar los ensayos con un aislado viral con este tipo de tropismo para tener datos más representativos acerca de la capacidad neutralizante de los plasmas de mujeres embarazadas.
- El aumento de la infectividad viral requiere de un mayor estudio y análisis, ya que podría tener una mayor relevancia en la transmisión perinatal, sobre todo porque existen mujeres que tienen un tratamiento con AZT y presentan este efecto de aumento en sus plasmas, lo cual podría potencializar la transmisión del virus.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

ANEXO 1

ELISA EN SANDWICH PARA ANTÍGENO p24 (Adalid, 1996)

SOLUCIONES:

Solución tampón de fosfatos salina (PBS) pH 7

8 g de cloruro de sodio
0.2 g de cloruro de potasio
1.44 g de fosfato dibásico de sodio
0.24 g de fosfato monobásico de sodio
aforar a 1 L con agua destilada

Solución tampón de pegado pH 7

PBS + 0.1 mM. merthiolate

Solución tampón de dilución pH 7

2 g de albúmina sérica bovina
2 mL de Tween 20
0.1 mM. merthiolate
aforar a 100 mL con PBS

Solución tampón de lisis

50 mL de agua desionizada
0.394 g de TRIS HCl
0.438 g de NaCl
0.5 mL de Tritón X100
0.5 g de deoxiglicolato
500 μ L de una solución stock 1M de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF)
aforar a 50 mL con agua destilada.

Solución tampón de citrofosfatos pH 5.5:

4.52 g de ácido cítrico
15.29 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado
aforar a 1 L con agua desionizada

Solución de paro (HCl 1 N):

36.5 mL ácido clorhídrico
diluir y aforar a 1 L con agua desionizada

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en una placa de poliestireno de 96 pozos 1 μg del anticuerpo 6C6 y 1 μg del anticuerpo 8G11 en 200 μL de buffer de pegado por cada pozo. Incubar la placa toda la noche a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Lavar la placa una vez con agua desionizada y eliminar todo el líquido residual. Bloquear la placa con 300 μL de buffer de dilución/poro durante 1h a 37°C.
3. Lavar la placa 4 veces con agua desionizada, secar sobre un papel absorbente.
4. Descongelar una alícuota de SN de células Molt (control negativo) y adicionar 100 μL en 4 pozos, agregar 100 μL de buffer de lisis a cada pozo.
5. Descongelar una alícuota del sobrenadante de IIIb/Molt (control positivo) con concentración conocida y hacer las diluciones necesarias para obtener 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ng/mL. Adicionar 100 μL en cada pozo (1E, 1F, 1G, 1H, 2A y 2B) y 100 μL de buffer de lisis.
6. Adicionar 100 μL de muestra y 100 μL de buffer de lisis a los pozos designados según el diseño del formato de ELISA. Incubar la placa toda la noche a temperatura ambiente o 3.5 hrs. a 37°C.
7. Eliminar el contenido de cada pozo sobre una solución desinfectante, lavar 4 veces con agua desionizada y secar sobre un papel absorbente. lavar 3 veces.
8. Adicionar la siguiente mezcla de anticuerpos marcados con peroxidasa: 1G3 en dilución 1:300, 1G10 en 1:1500 y 5E1 en dilución 1: 3,000 en 200 μL buffer de dilución/poro.
9. Incubar la placa 90 minutos a 37 °C.
10. Lavar la placa 4 veces con agua desionizada y secar sobre un papel absorbente.
11. Preparar la solución del sustrato: 1.5 mg/mL. de o-fenilendiamina en de buffer de citofosfatos más 0.02% de H_2O_2 , adicionar 200 μL por pozo. (Por cada 10 mL pesar 15 mg de OPD y 6.66 μL de H_2O_2).
12. Incubar la placa 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Adicionar 50 μL de la solución de paro
13. Leer la densidad óptica con un filtro de 492 nm teniendo como referencia un filtro de 620 nm.
14. Calcular la línea de corte con el promedio de los controles negativos más dos veces el valor de la desviación estándar de dichos valores.

ANEXO 2

Método de Reed-Muench para cuantificar DI_{50} .

Al realizar diluciones seriadas de un virus e infectar células en una placa de 96 pozos, se van a obtener pozos positivos y pozos negativos a medida que aumenta la dilución del virus. Con estos datos se puede calcular el porcentaje de pozos infectados a cada dilución y calcular las DI_{50} presentes en el SN de un cultivo viral. Para esto se realizan los cálculos de acuerdo al método de Reed-Muench; por ejemplo, si a una dilución 4^{-5} se obtiene el 75% de pozos infectados y en la dilución siguiente se obtiene el 25% de pozos infectados, el 50 % de infección se localiza entre estas dos diluciones, por lo que hay que calcular la distancia proporcional entre estas dos de la siguiente manera:

Log. de la dilución del virus	Pozos infectados	Por ciento de infección (%)
-4	4/4	100
-5	3/4	75
-6	1/4	25
-7	0/4	0

$$\frac{(\% \text{ positivos arriba de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ de positivos arriba de } 50\%) - (\% \text{ de pozos abajo del } 50\%)} = \text{Distancia proporcional.}$$

$$\frac{75\% - 50\%}{75\% - 25\%} = 0.5$$

Se calcula la dilución al 50%:

$\log DI_{50} = (\log \text{ dilución arriba del } 50\%) + (\text{distancia proporcional} \times \log \text{ del factor de dilución})$

$$(-5) + (0.5 \times -1.0) = -5.5$$

dilución = $4^{-5.5}$ recíproco: $DI_{50} = 4^{5.5}$

Al pasar el logaritmo base 4 a base 10 se obtiene:

$5.5 (\log_{10} 4) = 3.31$

Se debe tomar en cuenta el inóculo inicial de virus en el ensayo de $TCID_{50}$, si este fue de 50 μ L, se realizan los cálculos para obtener el número de $TCID_{50}$'s por mL:

$10^{3.31} DI_{50} / 0.05 \text{ mL}$

$20 \times 10^{3.31} DI_{50} / 1 \text{ mL}$

$10^{1.3} \times 10^{3.31} DI_{50} / 1 \text{ mL}$

$10^{4.61} DI_{50} / 1 \text{ mL}$

$4.08 \times 10^4 DI_{50} / \text{mL}$.

BIBLIOGRAFÍA

- Adalid L. Desarrollo de una ELISA para detectar antígeno p24 del VIH. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. 1996.
- Ahmad A. y Meneses J. 1996. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J.* 10: 258-66.
- Amigos contra el SIDA A. C. 1998. Casos de SIDA al final del 31 de octubre de 1998= Al iniciar el 1 de noviembre de 1998. <http://www.aids-sida.org>.
- Arcndrup M., Akerblom L., Heegaard P. M., Nielsen J. O. y Hansen J. E. 1995. The HIV-1 V3 domain on field isolates: participation in generation of escape virus *in vivo* and accessibility to neutralizing antibodies. *Arch. Virol.* 140:655-70.
- Bal A. K., Miller G., Viscarello R., y Andiman W. A. 1996. Syncytium-inhibiting and neutralizing activity in maternal sera fail to prevent vertical transmission of Human Immunodeficiency Virus type 1. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15: 315-20.
- Bertran P. W., Nunes W. M. y Haffar O. K. 1988. Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 *in vitro* and in continuous cell lines. *J. Virol.* 62: 3135-42.
- Bryson Y. J. 1996. Perinatal HIV-1 transmission: recent advances and therapeutic interventions. *AIDS* 10 (suppl 3): S33-S42.
- Bugelsky P. J., Mallef B. E., Klinkner, Ventre J. y Hart T. K. 1995. Ultrastructural Evidence of an Interaction between Env and Gag proteins during Assembly of HIV Type 1. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 11:55-64.
- Cavert W. y Haase A. T. 1998. A National Tissue Bank to Track HIV Eradication and Immune Reconstitution. *Science* 280: 1856-6.
- Clements G. J., Price-Jones M. J., Stephens P. E., Sutton C., Schulz T. F., Clapham P. R., McKeating J. A., McClure M. O., Thomson S., Marsh M., Kay J., Weiss R. A. y Moore J. P. 1991. The V3 loop of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoprotein contain proteolytic cleavage sites: a possible function in viral fusion? *AIDS Res. Hum. Retrov.* 7: 3-16.
- Devash Y., Calvelli T. A., Wood D. G., Reagan K. J. y Rubinstein A. 1990. Vertical transmission of human immunodeficiency virus is correlated with absence of high affinity/avidity maternal antibodies to the gp120 principal neutralizing domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 3445-9.
- Dickover R. E., Garratti E. M., Herman S. A., Sim M-S., Placger S., Boyer P. J., Keller M., Deveikis A., Stiehm E. R. y Bryson Y. J. 1996. Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with Risk of perinatal transmission. Effect of maternal Zidovudine treatment on viral load. *JAMA.* 275: 599-605.
- D'Souza M. P. y Mathieson B. J. 1996. Early phases of HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum Retroviruses.* 12: 1-9
- Emerman M. y Malim M. H. 1998. HIV-1 Regulatory/Accessory Genes: Keys to Unraveling Viral and Host Cell Biology. *Science* 280: 1880-4.
- Ferbas J. 1998. Perspectives on the Role of CD8⁺ Cell Suppressor Factors and Cytotoxic T Lymphocytes during HIV Infection. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 14 (S2): S153-S160.
- Ffrench R., Stewart G.J., Penny R. y Levy J. A. 1996. How HIV produces immune deficiency. *Med. J. Aust.* 164: 166-71.
- Gabuzda D. H., Lawrence K., Langhoff E., Terwilliger E., Dorfman T., Haseltine W. A. y Sodroski J. 1992. Role of vif in Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in CD4⁺ T Lymphocytes. *J. Virol.* 66: 6489-95.

- Gagnol A., Buckler W. A., Berkhout B. y Jeang K.-T. 1991. Characterization of a Human TAR RNA-Binding Protein That Activates the HIV-1 LTR. *Science* 251: 1597-600.
- Goedert J. y Dublin S. 1994. Perinatal transmission of HIV Type 1: Association with Maternal Anti-HIV Serological Reactivity. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 10: 1125-1134.
- Graziosi C., Soudeyns H., Rizzardi P., Bart P-R., Chapuis A. y Pantaleo G. 1998. Immunopathogenesis of HIV Infection. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 14 (S2): S135-S142.
- Halsey N. A., Markham R., Wahren B., Boulos R., Rossi P. y Wigzell H. 1992. Lack of association between maternal antibodies to V3 loop peptides and maternal-infant HIV-1 transmission. *J. Acqu. Immune Defic. Syndr.* 5: 153-7.
- Harada S., Koyanagi Y. y Yamamoto N. 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science.* 229: 563-6.
- Harrowe G. y Cheng-Mayer C. 1995. Amino acid substitution in the V3 loop are responsible for adaptation to growth in transformed T-cell lines of a primary human immunodeficiency virus type 1. *Virology.* 210:490-4.
- Haseltine W. A. 1991. Regulation of HIV-1 replication by *tat* and *rev*. En Genetic Structure and Regulation of HIV. Ed. Haseltine W. A. y Wong-Staal F. Raven Press, LTD., Nev York: 1-42.
- Haynes B. F., Pantaleo G. y Fauci A. S. 1996. Toward an Understanding of the correlates of Protective Immunity to HIV Infection. *Science.* 271: 324-8.
- Jansson M., Orlandi P., Scarlatti G., Moschese V., Romiti M. L., Cancrini C., Mancina L., Livadiotti S., Castelli-Gattinara G., Rossi P. y Halapi E. 1997. Role of immunity in maternal-infant HIV transmission. *Acta Paediatr. Suppl.* 421: 39-45.
- Jenkins M., Landers D., Williams-Herman D., Wara D., Viscarello R. R., Hammill H. A., Kline M. W., Shearer W. T., Charlebois E. D. y Kohl S. 1994. Association between antihuman HIV-1 Ab-dependence cellular cytotoxicity ab titers at birth and vertical transmission of HIV. *J. Inf. Dis.* 170: 308-12.
- Karlsson A., Parsmyr K., Sandström, Fenyö E. M. y Albert J. 1994. MT-2 Cell Tropism as Prognostic Marker for Disease Progression in Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. *J. Clin. Microb.* 32: 364-70.
- Karn J. 1995. HIV a practical approach vol. 1. IRL press. EUA: 117-27.
- Langston C., Lewis D. E., Hammill H. A., Popek E. J., Kozinetz C. A., Kline M. W., Hanson I. C. y Shearer W. T.. 1995. Excess intrauterine fetal demise associated with maternal human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 172: 1451-60.
- Landesman S. H., Kalish L. A., Burns D. N., Minkoff H., Fox H. E., Zorrilla C., Garcia P., Fowler M. G., Mofenson L. y Tuomala R. 1996. Obstetrical factors and the transmission of Human Immunodeficiency Virus type 1 from mother to child. *N. Eng. J. Med.* 334: 1617-23.
- Letvin N. L. 1998. Progress in the Development of an HIV-1 Vaccine. *Science* 280: 1875-80.
- Levy J. A. 1993. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiol. Rev.* 57: 183-289.
- Levy J. A. 1998. HIV and the Pathogenesis of AIDS. Second edition. ASM Press. USA.
- Levy J. A., Cheng-Mayer C., Tateno M., Evans L. A., y Homys J. 1990. The Biologic Heterogeneity of HIV and the pathogenesis of AIDS. En Gropman JE., Chen I. S. Y., Essex M. y Weiss R. A. Human Retroviruses. Wiley-Liss Inc. USA: 191-206.
- Mabondzo A., Rouvier P., Raoul H., Naour R. L., Hervé F., Parnet-Mathieu F., Lasfargues G. y Dormont D. 1995. Relationships between humoral factors in HIV-1-infected mothers and the occurrence of HIV infection in their infants. *Clin Exp Immunol* 102: 476-80.
- Marques M. J. Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas. Ed. McGraw-Hill. México 1991: 344-8.

- Martin N. 1996. Workshop on Perinatally Acquired Human Immunodeficiency Virus Infection in Long Term Surviving Children: A collaborative Study of Factors Contributing to Slow Disease Progression. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 12: 1565-70.
- McDougal J. S., Kennedy M. S., Orloff S L., Nicholson J. K. y Spira T. J. 1996. Mechanism of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) neutralization: irreversible inactivation of infectivity by anti-HIV-1 antibody. *J. Virol.* 70: 5236-45.
- McKeating J. 1995. Quantitative assay for virus neutralization. En J. Karn. HIV a practical approach vol. 1. IRL press. EUA: 117-27.
- McKeating J. A. 1996. Biological Consequences of HIV-1 Envelope Polymorphism; Does Variation Matter? *J. Gen. Virol.* 77: 2905-14.
- McMichael A. J. 1996. HIV The immune response. *Curr. Op. Immunol.* 8: 537-39.
- Minkoff H. y Willoughby A. 1995. Pediatric HIV disease, Zidovudina in pregnancy, and unblinding heelstick surveys. *JAMA* 274: 1165-8.
- Moore J. P. 1997. Coreceptors: Implications for HIV Pathogenesis and Therapy. *Science* 276: 51-2.
- Moulard M., Chaloin L., Canarelli S., Mabrouk K. y Darbon H. 1998. Retroviral envelope gp processing: Structural Investigation of the Cleavage Site. *Biochem.* 37: 4510-17
- ONUSIDA. 1998. La epidemia del SIDA: Situación en diciembre de 1998. <http://www.unaids.org>.
- Pantaleo G. y Fauci A. S. 1995. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 487-512
- Parren P. W., Gauduin M. C., Koup R. A., Poignard P., Sattentau Q. J., Fiscaro P. y Burton D. R. 1997. Erratum to "Relevance of the antibody response against human immunodeficiency virus type 1 envelope to vaccine design" (corrected and republished article originally printed in *Immunol. Lett.* 57:105-12) *Immunol. Lett.* 58:125-32.
- Piatak M., Saag S. J., Yang L. C., Kappes J. V., Luk K.-C., Hahn B. H., Shaw G. M. y Lifson J. D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science.* 259: 1749-54.
- Pilgrim A. K., Pantaleo G., Cohen O. J., Fink L. M., Zhou J. Y., Zhou J. T., Bolognesi D. P., Fauci A. S. y Montefiori D. C. 1997. Neutralizing Antibody Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Primary Infection and Long-Term-Nonprogressive Infection. *J. Inf. Dis.* 176: 924-32.
- Poignard P., Fouts T., Nanche D., Moore J. P. y Sattentau Q. J. 1996a. Neutralizing Antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type-1 gp120 Induce Envelope Glycoprotein Subunit Dissociation. *J. Exp. Med.* 183:473-84.
- Poignard P., Klasse P. J. y Sattentau Q. J. 1996b. Antibody neutralization of HIV-1. *Immunol. today.* 17: 239-46.
- Price D. A., Goulder P. J. R., Klenerman P., Sewell A. K., Easterbrook P. J., Troop M., Bangham C. R. M. y Phillips R. E. 1997. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1890-5.
- Rodrigo A. G. 1997. Dynamics of Syncytium-Inducing and Non-Syncytium-Inducing Type 1 Human Immunodeficiency Viruses during Primary Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 13: 1447-51.
- Rosenberg E. S. y Walker B. D. 1998. HIV Type-Specific Helper T Cells: A Critical Host Defense. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 14 (S2): S143-S147.
- Rubinstein A., Goldstein H., Calvelli T., Devash Y., Rubinstein R., Soeiro R. y Lyman W. 1993. Maternofetal transmission of Human Immunodeficiency Virus-1: The role of antibodies to the V₃ primary neutralizing domain. *Pediat. Res.* 33:S76-8.
- Sattentau Q. J. 1996. Neutralization of HIV-1 by antibody. *Curr. Op. Immunol.* 8:540-5.
- Scarlatti G. 1996. Interplay of HIV-1 phenotype and neutralizing antibody response in pathogenesis of AIDS. *Immunol. letters.* 51: 23-8.

- Schreiber M., Müller H., Wachsmuth C., Laue T., Hufert F. T. y Van laer M. D. 1997 Escape of HIV-1 is associated with lack of V3 domain-specific antibodies *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.* **107**: 15-20.
- Spearman P., Wang J. J., Vander H. N. y Ratner L. 1994. Identification of Human Immunodeficiency Virus type 1 Gag Protein Domain Essential to Membrane Binding and particle Assembly. *J. Virol.* **68**: 3232-42.
- Toniolo A., Serra C., Conaldi P. G., Basolo F., Falcone V. y Dolei A. 1995. Productive HIV-1 infection of normal human mammary epithelial cells. *AIDS* **9**: 859-66.
- Turner B. G. y Summers M. F. 1999. Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**: 1-32.
- Ugen K. E., Srikantan V., Goedert J. J., Nelson R. P., Williams W. V. y Weiner D. B. 1997. Vertical transmission of Human Immunodeficiency Virus type 1: Seroreactivity by maternal antibodies to the carboxy region of the gp41 envelope glycoprotein. *J. Inf. Dis.* **175**:63-9.
- Wyatt R. y Sodroski J. 1998. The HIV-1 Envelope Glycoprotein: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science* **280**: 1884-8.
- Zolla-Pazner S. 1996. Mechanisms contributing to the neutralization of HIV. *Immunol. letters.* **51**:89-93.