

HIPERLACTACIDÈMIA EN EL FILL DE MARE VIH I EXPOSAT A ANTIRETROVIRALS (2004-2007)

ESTUDI DE COHORTS, OBERT I PROSPECTIU.

Pere Soler Palacín.

Unitat de Patologia Infecciosa i
Immunodeficiències de Pediatria.
Hospital Universitari Vall d'Hebron.
Universitat Autònoma de Barcelona.

Direcció: Dra. C. Figueras Nadal.
i Prof. Antonio Mur Sierra.

Presentació del Projecte: 8 d'octubre de 2007.
Aprovació del Projecte: 30 d'octubre de 2007.
Dipòsit: 10 de novembre de 2010.



La Dra. **Concepció Figueras Nadal** de la Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i el Dr. **Antonio Mur Sierra**, professor del Departament de Pediatria de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN: que el treball de tesi del programa de doctorat del Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva, presentat per PERE SOLER PALACIN amb el títol "HIPERLACTACIDÈMIA EN EL FILL DE MARE VIH I EXPOSAT A ANTIRETROVIRALS (2004-2007). ESTUDI DE COHORTS, OBERT I PROSPECTIU", s'ha realitzat sota la nostra supervisió, reuneix les condicions necessàries per a ser presentat com a tesi per a optar al grau de Doctor en Medicina.



Concepció Figueras Nadal



Antonio Mur Sierra

Bellaterra, 8 de novembre de 2010

1. SUMARI:

1. Sumari	2
2. Abreviatures utilitzades	4
3. Resum de l'estudi	6
4. Introducció	12
5. Objectius, pacients i mètodes	21
5.1. Malaltia a estudi	21
5.2. Població a estudi	21
5.3. Durada de l'estudi	22
5.4. Hipòtesi	22
5.5. Objectiu	22
5.6. Tipus d'estudi	22
5.7. Selecció de pacients	22
5.8. Variables a estudi	23
5.9. Anàlisi estadística	24
5.10. Tipus i número d'exploracions a realitzar	24
5.11. Aspectes humans. Consentiment informat	25

6. Resultats	27
6.1. Dades maternes	29
6.2. Dades obstètriques	35
6.3. Dades dels nens	37
7. Discussió	54
8. Limitacions de l'estudi	65
9. Conclusions	66
10. Agraïments	67
11. Bibliografia	68
12. Annex	85

2. ABREVIATURES UTILITZADES

Abreviatura	Significat
3TC	Lamivudina
ACTG	<i>AIDS clinical trials group</i>
ABC	Abacavir
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
ARV	Fàrmacs antiretrovirals
AZT	Azidotimidina o zidovudina
CD4	Limfòcits CD4+
CDC	<i>Centre for disease control and prevention</i>
CoRISpe	Cohort pediàtrica de la RIS (Red Española de Investigación en SIDA)
CV	Càrrega viral
d4T	Estavudina
ddC	Zalcitabina
ddl	Didanosina
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
EFV	Efavirenz

Abreviatura	Significat
FIPSE	Fundación para la Investigación y la Prevención del Sida en España
FTC	Emtricitabina
IC95	Intèrval de confiança del 95%
IP	Inhibidors de la proteasa
IV	Intravenós
LPV/r	Lopinavir potenciat amb ritonavir
NENEXP	Cohort de nens exposats a profilaxi antiretroviral de Catalunya
NNRTI	Inhibidors de la retrotranscriptasa no analègs de nucleòsid
NRTI/NtRTI	Inhibidors de la retrotranscriptasa anàlegs de nucleòsid o nucleòtid
NVP	Nevirapina
pACTG	<i>Pediatric AIDS Clinical Trials Group</i>
SIDA	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
TARGA	Tractamento antiretroviral de gran activitat
TDF	Tenofovir
VHB	Virus de l'hepatitis B
VHC	Virus de l'hepatitis C
VIH	Virus de la immunodeficiència humana

3. RESUM DE L'ESTUDI

Introducció: actualment, i des de la instauració universal del protocol ACTG 076 als països desenvolupats, tots els fills de mare infectades pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) (si aquest fet es coneix abans o durant la gestació) es troben exposats a antiretrovirals (ARV) durant el període pre i intrapart i fins a les 4-6 setmanes de vida, com a mesura per a evitar la transmissió vertical de la infecció.

Múltiples publicacions han relacionat als darrers anys l'exposició a antiretrovirals en fills de mare amb infecció pel VIH amb hiperlactacidèmia (fins i tot simptomàtica) i acidosi làctica, havent-se descrit per part de la cohort francesa casos d'afectació neurològica i mort, que no han estat confirmats per d'altres grups. S'ha postulat que l'afectació de la polimerasa γ de l'àcid desoxiribonucleic (ADN) mitocondrial descrita en pacients que reben tractament antiretroviral amb anàlegs de nucleòsids és la responsable d'aquesta hiperlactacidèmia. Molts d'aquests estudis estan subjectes a biaixos metodològics que poden alterar-ne els resultats. El control de tots aquests factors i la determinació conjunta d'alanina plasmàtica hauria de permetre obtenir unes dades més aproximades a la realitat d'hiperlactacidèmia en aquesta població.

Objectius: objectiu primari: determinació de la incidència d'hiperlactacidèmia, acidosi làctica i manifestacions neurològiques associades a pacients fills de mare amb infecció pel VIH (no infectats) i fills de mare amb infecció pel virus de l'hepatitis C (VHC) durant el primer any de vida. Objectiu secundari: determinació dels paràmetres associats a la presència d'hiperlactacidèmia en ambdós grups així com la seva relació amb la presència de manifestacions neurològiques i amb el neurodesenvolupament.

Pacients i mètodes: es tracta d'un estudi clínic comparatiu de cohorts prospectives amb una mostra de 40 pacients en cada grup i amb l'obtenció d'un total de 320 mostres sanguínies (160 por grup) per a obtenir una potència estadística suficient per a detectar diferències estadísticament significatives, acceptant una prevalença d'hiperlactacidèmia del 50% en pacients amb tractament antiretroviral, unes pèrdues de seguiment del 10% i un risc alfa de 0,05, per a una precisió del 5% en un contrast bilateral. Així, des d'octubre de 2004 i fins a octubre de 2007 s'ha procedit a la inclusió de pacients fills de mare VIH positiva, no infectats, en aquest estudi (cohort exposada). Al llarg de l'estudi s'ha descartat la infecció pel VIH per transmissió vertical seguint les recomanacions nacionals del moment i posteriorment s'ha comprovat la seroreversió (desaparició dels anticossos materns en sang del nen) entre els 18 i 24 mesos d'edat. Alhora, i tenint en compte que els fills de mare amb VHC comparteixen una periodicitat similar en els controls analítics, s'ha utilitzat aquest grup de pacients com a grup de comparació (cohort no exposada) realitzant-se els mateixos controls clínics i les mateixes determinacions analítiques. Es realitza determinació conjunta de pH, àcid làctic i alanina (i resta d'aminoàcids plasmàtics) en els controls analítics periòdics a les 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos de vida en tots aquests pacients. La mostra és tramesa immediatament i en condicions adequades al laboratori de metabolopaties del nostre centre on es processa immediatament. Es va considerar com a hiperlactacidèmia veritable o patològica aquella que associava uns valors de lactat plasmàtic superiors a 2,1 mmol/L i una alanina plasmàtica superior a 435 micromols/L. Es realitzarà estudi estadístic descriptiu i analític de les dades obtingudes, mitjançant SPSS versió 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Resultats: s'inclogueren un total de 79 pacients: 39 a la cohort exposada i 40 a la cohort no exposada. L'edat mitjana de les mares incloses a l'estudi, la majoria caucàsiques, fou d'aproximadament 32 anys. Tot i no ser una dada recollida de forma sistemàtica, fins en un quart de les mares es constatà la ingesta de tòxics durant la gestació, sent freqüent la politoxicomania. Quinze de les 39 mares de la cohort exposada (39,5%) estaven coinfectades pel VHC i dues de la cohort de comparació pel virus de l'hepatitis B (VHB). Un 89,7 % de les gestants del grup exposat va rebre TARGA durant la gestació (un 40% va rebre la combinació AZT/3TC/NVP) mentre que un 10,3% va rebre monoteràpia amb zidovudina (AZT). Només un 54% presentaven una càrrega viral (CV) indetectable prèvia al part i un 20% de mares presentaven un recompte de limfòcits CD4+ per sota de 350/mm³. Fins a un 27,2% de les mares estaven classificades com a afectes de síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) per criteris clínics i/o immunològics. La majoria de les gestacions en ambdós grups varen ser a terme amb una durada mediana de 38 setmanes. Mentre la cesària programada suposà un 70,3% dels parts al grup exposat, només es va realitzar en un 25% de les mares del grup de comparació. S'administrà AZT intravenós intrapart a un 92,3% de les gestants del grup exposat. Es constatà un lleu predomini de nenes en la població estudiada amb un pes al néixer superior als 2.500 g, sense diferències entre ambdós grups. Al grup exposat, 31 nens reberen monoteràpia amb AZT i 8 triple teràpia amb AZT, lamivudina i nevirapina. Respecte a la infecció pel VHC, 2/16 (12,5%) nens del grup exposat, fills de mare coinfectada VIH-VHC, i 2/40 (5%) del grup de comparació es diagnosticaren d'infecció crònica pel VHC. Tot i trobar-se els valors mitjans de pes, talla i perímetre cefàlic dels pacients d'ambdós grups lleugerament per sota dels

corresponents a aquestes edats a la nostra població, els resultats queden inclosos als intervals de normalitat. Dotze pacients (5 a la cohort exposada i 7 a la cohort control) van presentar algun tipus de trastorn neurològic i un total de 4 pacients (5,1%) (1 a la cohort d'exposats i 3 a la cohort control) presentaven un desenvolupament psicomotor amb deficiències en l'adquisició d'ítems respecte al considerat com a normal per aquesta edat, sense diferències significatives entre ambdós grups (p: 0,34). Dels 316 estudis metabòlics esperats, es disposà de resultats complets en 246. Es va detectar un augment de lactat patològic (major a 2,1 mmol/L) fins en un 91% (72/79) de pacients en alguna de les determinacions realitzades, disminuint aquesta xifra a un 57% (45/79) dels pacients quan es considerà com a hiperlactacidèmia aquella que s'acompanyava en la mateixa determinació d'una elevació d'alanina plasmàtica superior a 435 micromols/L.

No es van trobar diferències entre ambdós grups, pertanyent 22 pacients a la cohort exposada i 23 a la cohort de control el que suposa un 56,4% (IC95% 39,6-72,2) i un 57,5% (IC95% 40,9-73,0) dels subtotals corresponents (p: 0,92). No es va constatar cap cas d'acidosi làctica. Entre les diferents variables potencialment associades amb la presència d'hiperlactacidèmia, només es detectà una associació amb la prematuritat. No es van identificar com a factors de risc estadísticament significatius per a la presència d'hiperlactacidèmia al nen la presa de TARGA durant la gestació, el tipus d'ARV, diagnòstic de SIDA a les gestants, les xifres de limfòcits CD4+ i CV pre-part o la presa d'ARV per part del nadó a les primeres 6 setmanes de vida. Es va detectar una major freqüència d'hiperlactacidèmia en pacients sense manifestacions neurològiques (p: <0,05). A més, cap dels pacients que varen presentar manifestacions neurològiques

o retard psicomotor va presentar una hiperlactacidèmia mantinguda. Tots els nens inclosos, que en el moment de redactar-se el document tenen una edat mediana de 4,7 anys [rang interquartílic. 4,4-5,4], estan vius.

Discussió: el present treball detecta una incidència significativa d'hiperlactacidèmia asimptomàtica durant el primer any de vida en una cohort de fills de mare VIH exposats a ARV. Tot i això, detecta una incidència d'hiperlactacidèmia similar en una població que comparteix la majoria de característiques, exceptuant l'exposició al VIH i als ARV, i només s'estableix una relació estadísticament significativa entre la presència d'hiperlactacidèmia i la de prematuritat, no sent així per als factors relacionats amb el VIH i el tractament ARV. No s'observen diferències entre ambdós grups respecte a la presència de manifestacions neurològiques dels pacients, però el percentatge de nens que van presentar algun tipus de manifestació neurològica fou elevat en ambdós grups, possiblement en relació a un seguiment molt estret d'ambdues cohorts. A més, cal tenir present que en la major part dels casos, es podien descriure factors de risc associats (com la ingesta de tòxics per part de la mare durant la gestació o la prematuritat). En els 4 pacients amb retard psicomotor es van detectar causes d'origen no mitocondrial que el justificaven a més de descartar-se una hiperlactacidèmia mantinguda, fets que fan poc probable la patologia mitocondrial com a causa del retard el diagnòstic de patologia mitocondrial.

Un dels punts més important del treball és la coincidència de dades epidemiològiques amb cohorts molt més àmplies tant del nostre medi com de fora.

Conclusions: les dades aportades no demostren una associació entre l'ús d'ARV intraúter, intrapart i postpart i l'aparició d'hiperlactacidèmia. Només la presència de

prematuritat s'associa a una major incidència d'hiperlactacidèmia. A més, no es demostra l'associació d'aquesta amb l'aparició de simptomatologia neurològica. Caldrà estar molt pendent del resultat dels estudis multinacionals que estan en marxa per a saber l'abast real d'aquesta possible associació.

4. INTRODUCCIÓ

La transmissió vertical constitueix la principal via d'adquisició de la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) a l'edat pediàtrica tant en els països en vies de desenvolupament com al nostre medi^{1,2}. Prèviament a la instauració de les mesures de prevenció, la taxa de transmissió als països on l'alletament matern està contraindicat oscil·lava entre un 15 i un 25 %, segons les sèries, dels quals un 35-45% s'infectaven durant l'embaràs (infecció intraúter) i un 65-55% durant el part (infecció intra o peripart).¹⁻⁴ Als països en vies de desenvolupament on es permet l'alletament matern (amb el consegüent risc d'infecció postnatal), la taxa de transmissió augmenta fins un 35-45%.⁵

Al nostre país, el primer nen diagnosticat d'infecció per VIH per transmissió vertical, es va comunicar el 1984, i aquesta havia estat la via d'infecció d'un total de 837 nens fins l'any 2000⁶. A l'actualitat, la cohort estatal de nens infectats per VIH (CoRISpe) recull, a juny de 2010, un total de 639 pacients menors de 18 anys que es controlen als diferents centres especialitzats de l'estat, un 96,6% dels quals es van infectar per transmissió vertical (dades no publicades). Amb la incorporació progressiva de les recomanacions diagnòstiques i terapèutiques a la pràctica clínica habitual s'ha observat una gran disminució a la taxa de transmissió: des del 20,9% abans de 1995 al 6,7% entre 1995 i 1997 amb l'administració segons el protocol ACTG076 de zidovudina (AZT) durant l'embaràs, el part i 6 setmanes al nounat,⁷ i al 2,9% (interval de confiança (IC) 95%: 1,8 – 4,3%) en el període 1998-2004 amb l'aparició del tractament antiretroviral de gran activitat (TARGA) administrat a la mare, la selecció del tipus de part i el tractament amb AZT al nounat.^{6,8}

La cohort francesa descriu un percentatge de transmissió vertical del 0,4% en aquells casos en que el part es produeix a terme i la mare presenta una càrrega viral indetectable peripart⁹. Aquest risc podria ser encara menor quan la indetectabilitat s'aconsegueix de manera precoç, abans de les 30 setmanes de gestació.

A la "Cohorte FIPSE de Madrid"; durant el període 2000-2005, aquesta taxa va presentar el seu mínim absolut, només l'1,4% (9/632) dels fills nascuts de mare infectada pel VIH es varen infectar. Cal destacar que en 8 dels 9 dels nous casos no s'havia realitzat una pauta de prevenció completa, pel que la taxa de transmissió dels casos que s'havia fet un pauta de profilaxi completa va ser menor de l'1%.¹¹

La cohort catalana de fills de mares infectades pel VIH (projecte NENEXP) que inclou un total de 846 embarassos, recull una transmissió en el període 1998-2009 de l'1,5% (12/830) (dades no publicades), similar a d'altres grans cohorts europees.

Així, si s'identifica precoçment la infecció a l'embarassada, es pot prevenir gairebé en la seva totalitat la transmissió del VIH de la mare al nen, sempre que s'asseguri la informació adequada i l'accés al control obstètric i al tractament a mare i nen.

Tot aquest procés d'administració d' antiretrovirals (ARV) a la gestant i al nadó, no ha estat exempt de dubtes sobre la seguretat d'aquests fàrmacs. Així, les sospites inicials sobre un major risc de malformacions o neoplàsies en aquesta població han estat rebutjades per articles recents que inclouen un major número de pacients i un major seguiment en el temps.¹²⁻¹⁶ Tot i això, sí s'ha demostrat la inclusió d'AZT i lamivudina (3TC) a l'àcid desoxiribonucleic (ADN) de simis i humans, pel que no es pot descartar el risc de carcinogènesi a mig o llarg termini.¹⁷ De la mateixa manera, s'han descrit alteracions hematològiques persistents com macrocitosi, anèmia microcítica i

hipocroma o neutropènia en aquests pacients.¹⁸⁻²⁰ En canvi, estudis recents descarten que els nens exposats intraúter a ARV desenvolupin alteracions en l'evolució neurocognitiva i pondoestatural.²¹⁻²⁴

Un dels problemes associats a aquesta administració intraúter d'ARV sobre el que més s'ha escrit i possiblement sobre el que menys dades definitives es té és el dany mitocondrial, l'aparició d'hiperlactacidèmia o acidosi làctica i la repercussió sobre la salut del nadó secundàries a ARV en forma de miopatia, neuropatia perifèrica i/o esteatosi hepàtica amb acidosi làctica, que poden arribar a ser causa de risc vital.

Cal revisar, doncs, la relació entre l'ús d'ARV i un possible dany mitocondrial i les seves conseqüències.

La principal funció de la mitocondria – organel·la present a totes les cèl·lules humanes excepte als eritròcits - és la fosforilació oxidativa que utilitza àcids grassos i piruvat com a substrats per a obtenir energia en forma d'adenosina trifosfat (ATP). En situacions normals, s'estableix una estreta relació entre l'oxidació i la fosforilació (procés OXPHOS) controlada per enzims mitocondrials com les oxidases citocròmiques i d'altres enzims de la cadena respiratòria. El procés d'OXPHOS també és responsable de la neutralització dels radicals lliures i de la β -oxidació dels àcids grassos lliures²⁵.

La mitocondria també juga un paper important en la generació d'espècies d'oxigen reactiu (ROS de *reactive oxygen species*) que es produeixen fisiològicament durant el procés de fosforilació oxidativa. Pot produir-se un estrès oxidatiu en cas de desbalanç entre la producció de ROS i les defenses antioxidants cel·lulars, actuant l'ADN mitocondrial (ADNmt) com a diana del dany oxidatiu.

L'ADNmt codifica 13 polipèptids mitocondrials que participen en la cadena respiratòria essencial per a la fosforilació oxidativa. Una disrupció de l'OXPHOS suposa una pèrdua d'energia (descens d'ATP) i una major fuga d'electrons de la cadena de transport d'electrons, que suposa finalment un augment de ROS. Aquests ROS suposen dany proteic, lipídic i de l'ADNmt que perpetua la cascada de dany oxidatiu i peroxidació lipídica.

L'efecte immediat del dany mitocondrial és un descens de la producció d'energia amb el consegüent augment de producció d'àcid làctic. En una situació normal, durant la glicòlisi, la glucosa es metabolitza a piruvat i es produeix energia en forma d'ATP. El piruvat és recaptat per la mitocòndria i metabolitzat a acetil-CoA, que participa al cicle de Krebs. Aquesta via metabòlica és responsable de la major part de producció energètica cel·lular. En cas de disfunció mitocondrial, el metabolisme del piruvat es redirigeix cap a la producció de lactat i una menor producció energètica.

L'expressió del dany mitocondrial pot no ocórrer fins a que se supera un "llindar de disfunció mitocondrial" que està en funció de les característiques cel·lulars ja que tant les còpies d'ADNmt com les necessitats energètiques són variables^{26,27}.

Els anàlegs de nucleòsid o nucleòtid (NRTi/NtRTI) exerceixen el seu efecte antiretroviral a través de la seva elevada afinitat per la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa (una polimerasa de l'ADN viral). Tot i això, aquesta família d'ARV també poden unir-se a d'altres polimerases de l'ADN humà, com la polimerasa β de l'ADN (necessària per a la reparació de l'ADN nuclear) i la polimerasa γ de l'ADN mitocondrial, exclusivament responsable de l'ADN mitocondrial²⁸⁻³⁰.

En produir aquesta inhibició de la polimerasa γ de l'ADN mitocondrial, els NRTI/NtRTI poden provocar una depleció de l'ADN mitocondrial que resulti en una disfunció de l'organel·la i alteració de la fosforilació oxidativa (**Figura 1**).

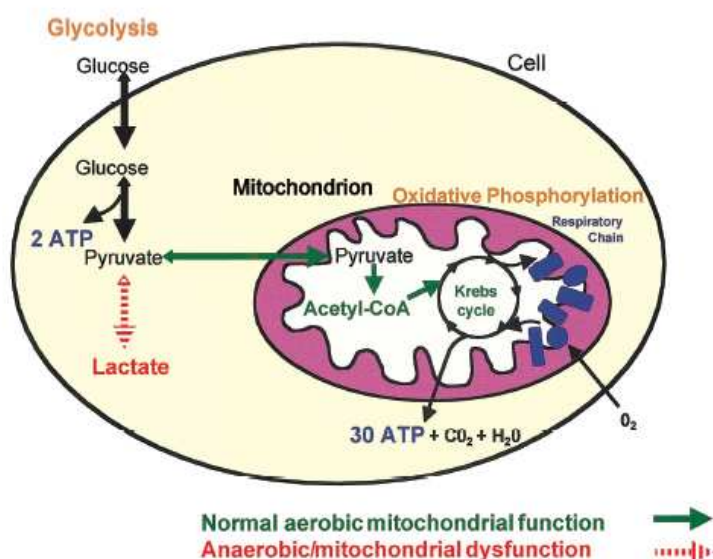


Figura 1. Esquema de la glicòlisi i el metabolisme de fosforilació oxidativa en absència (verd) i presència (vermell) d'afectació mitocondrial. ATP: Adenosina trifosfat; CoA: Coenzima A. *Imatge presa de referència 87.*

Cal tenir present, però, que el dany mitocondrial associat a l'ús de fàrmacs és previ a l'aparició dels ARV i s'ha descrit amb diversos fàrmacs com les tetraciclins, àcid valproic, amiodarona o d'altres com fialuridina, anàleg de nucleòsid per al tractament de l'hepatitis B que va haver de suspendre el seu procés de comercialització atesa la demostració de risc de dany mitocondrial en forma d'esteatosi hepàtica i hepatitis fulminant³¹.

En quant als NRTI/NtRTI s'ha descrit una gradació d'afinitat per la polimerasa γ mitocondrial: zalcitabina (ddC) \gg didanosina (ddI) $>$ estavudina (d4T) \geq zidovudina

(ZDV) >>> tenofovir (TDF) = lamivudina (3TC) = emtricitabina (FTC) = abacavir (ABC)³²⁻

³⁴.

Estudis *in vitro* han demostrat que ddC (ja retirat del mercat), ddl i d4T estan especialment relacionats amb la depleció d'ADNmt i canvis ultraestructurals que inclouen edematització i augment de tamany de la mitocondria i pèrdua o distorsió dels seus cristalls. S'han descrit factors que explicarien aquesta varietat d'efectes sobre la polimerasa γ mitocondrial com la capacitat d'entrada a la cèl·lula del fàrmac o el transport a través de la membrana mitocondrial²⁸.

S'han descrit diverses manifestacions clíniques associades a disfunció mitocondrial en els pacients exposats a NRTi/NtRTi: miopatia, neuropatia, lipoatròfia i acidosi làctica. La patogènia mitocondrial d'alteracions com la pancreatitis, la mielosupressió o la miocardiopatia és menys clara³⁵.

L'acidosi làctica associada a NRTi/NtRTi ocorre en absència d'hipoperfusió sistemica, és més freqüent en cas de dany hepàtic (pel mecanisme de depuració hepàtica de l'àcid làctic), acostuma a ser simptomàtica amb valors de lactat ≥ 5 mEq/L i pot portar el pacient a una situació de risc vital. S'ha descrit associada tant a la monoteràpia amb AZT i/o ddl com a la teràpia combinada que inclou ddl i/o d4T. Apareix normalment després de 6 mesos de tractament, tot i que pot presentar un inici abrupte. La seva prevalença ronda l'1% anual, sent molt més freqüent l'hiperlactacidèmia asimptomàtica - valors de lactat < 5 mEq/L - (10-40%) i s'observa especialment en pacients que reben ddl i d4T en combinació³⁶⁻⁴⁰.

La simptomatologia associada a l'acidosi làctica secundària a dany mitocondrial per NRTi/NtRTi és inespecífica i inclou: nàusees, vòmits, abdominàlgia, pèrdua de pes i fatiga important. Habitualment, no associa hipertransaminasèmia significativa⁴¹.

En cas que no es detecti la seva presència i se suspengui el fàrmac potencialment associat, pot portar a la mort, sovint causa de fracàs hepàtic o arítmies.

Mentre l'existència i repercusió del dany mitocondrial associat a NRTi/NtRTi sembla clara en el pacient amb infecció pel VIH en tractament antiretroviral, la seva relació amb l'exposició *in utero* en pacients fills de mare amb infecció pel VIH que reben NRTi/NtRTi - tema que ens ocupa – és menys clara.

Tot i l'existència d'alguns treballs previs, l'alarma sobre aquest fet saltà quan la cohort francesa presentà, l'any 1999, 8 casos de disfunció mitocondrial simptomàtica (principalment neurològica) en fills de mare VIH exposats a antiretrovirals durant la gestació i el període neonatal, 2 dels quals van morir.⁴² Quatre d'aquests pacients havien estat exposats a AZT i 3TC i els altres 4 només a AZT. Els autors refereixen alteracions, absolutes o relatives, persistents durant mesos o anys als complexos I i/o IV de la cadena respiratòria mitocondrial en tots els casos, pel que atribueixen una relació causal entre aquesta alteració i les manifestacions clíniques i analítiques. Cal dir, però, que aquestes dades no han estat corroborades per altres grups posteriorment. Així, el mateix any grups anglesos i australians varen posar en dubte els resultats de la cohort francesa, tot i que recomanaven la realització de més estudis atesa la gravetat dels efectes secundaris descrits.^{43,44} En aquest sentit, el col·laboratiu MITOC (actualment en fase d'inclusió de pacients) pretén estudiar les repercussions neurològiques dels fills de mare VIH exposats a ARV en una amplia cohort europea

d'uns 3000 pacients. Està també en marxa un estudi similar realitzat als Estats Units d'Amèrica (EUA). No es disposa encara dels resultats d'aquests dos projectes internacionals.

Diversos estudis han demostrat el dany mitocondrial dels fàrmacs ARV de la família dels inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsids tant en simis com en humans⁴⁵⁻⁵³ i s'han descrit casos d'hiperlactacidèmia simptomàtica i d'acidosi làctica en pacients infectats pel VIH, tant adults⁵⁴⁻⁵⁶ com pediàtrics^{57,48}, fins i tot fatals^{59,60}. Així, l'estudi de 2010 de Crain MJ et al⁶⁰, on s'estudien fins a 2931 nens inclosos als pACTG 219 i 219C amb infecció pel VIH de transmissió vertical demostren un possible dany mitocondrial fins en un 20% de casos i una associació amb l'ús d'estavudina (d4T) i 3TC. A més, en aquest estudi, la mortalitat és major en els pacients que compleixen criteris de dany mitocondrial. Tot i això, estudis que han avaluat la substitució de d4T per d'altres ARV teòricament menys tòxics per a la mitocòndria no han demostrat canvis significatius en el contingut d'ADN mitocondrial⁶¹.

A la mateixa cohort, però en nens exposats a ARV i no infectats pel VIH, Brogly SB et al⁵⁰, estudien un total de 1037 nens i constaten una possible associació entre l'administració d'AZT o AZT/3TC a la gestant durant el tercer trimestre de la gestació i l'aparició de signes de disfunció mitocondrial al nen. Tot i això, remarquen la necessitat de realitzar estudis metodològicament més acurats per a descartar potencials factors de confusió.

És molt interessant remarcar que sobre aquesta mateixa cohort americana, Williams PL et al⁶² realitzen una avaluació del neurodesenvolupament sense detectar diferències entre els nens exposats i els no exposats a ARV als 2 anys.

Estudis realitzats al nostre medi els darrers anys demostren la presència d'hiperlactacidèmia asimptomàtica en gairebé la meitat dels nens exposats a ARV, amb pràctica absència d'afectació en el neurodesenvolupament⁶³, dades que varen portar a la realització del present estudi.

5. OBJECTIUS, PACIENTS I MÈTODES

Estudi clínic comparatiu de cohorts prospectives obert realitzat des d'octubre de 2004 fins a octubre de 2007 (inclusió de pacients fins a octubre de 2006). En total, per a obtenir una potència estadística suficient per a detectar diferències estadísticament significatives, acceptant una prevalença d'hiperlactacidèmia del 50% en pacients amb tractament antiretroviral, unes pèrdues de seguiment del 10% i un risc alfa de 0,05, per a una precisió del 5% en un contrast bilateral es requereix una mostra de 40 pacients en cada grup amb un total de 320 mostres estudiades (160 per grup).

5.1. Malaltia a estudi: hiperlactacidèmia secundària a disfunció mitocondrial. Es catalogarà com a pacient afecte d'hiperlactacidèmia tot aquell que presenti com a mínim una determinació de lactat de > 2.1 mmol/L acompanyada d'elevació d'alanina (>435 micromols/L a plasma) a qualsevol dels controls analítics de seguiment.

5.2. Població a estudi:

Cohort exposada: nadons nascuts al nostre centre durant el període d'estudi fills de mares VIH positives (no infectats) exposats al tractament antiretroviral matern durant la gestació i a AZT o triple teràpia durant les quatre o sis primeres setmanes de vida com a part del protocol establert al nostre centre per a disminuir el risc de transmissió vertical del VIH. Al llarg de l'estudi s'ha descartat la infecció pel VIH per transmissió vertical seguint les recomanacions nacionals del moment i posteriorment s'ha comprovat la seroreversió entre els 18 i 24 mesos d'edat.

Cohort de control (no exposada): nadons nascuts al nostre centre durant el període d'estudi fills de mares amb infecció pel virus de la l'hepatitis C (VHC), infectats o no pel VHC, sense cap exposició a tractament antiretroviral.

5.3. Durada de l'estudi: 3 anys (octubre de 2004 a octubre de 2007).

5.4. Hipòtesi: la presència d'hiperlactacidèmia en fills de mare amb infecció pel VIH exposats a fàrmacs antiretrovirals durant els períodes prenatal, intrapart i postnatal es major que en aquells nounats que no estan exposats a aquests fàrmacs. Aquesta hiperlactacidèmia està principalment associada amb la administració d'anàlegs de nucleòsid a la gestant i/o al nadó i pot associar-se a una major incidència de manifestacions neurològiques i/o alteracions del neurodesenvolupament en aquells nens que la presentin. La determinació seriada d'àcid làctic i alanina plasmàtica ha de permetre identificar els pacients en risc de presentar aquestes anomalies.

5.5. Objectiu:

5.5.1. Objectiu primari: determinació de la incidència d'hiperlactacidèmia, acidosi làctica i manifestacions neurològiques associades a pacients fills de mare amb infecció pel VIH (no infectats) i fills de mare amb infecció pel VHC durant el primer any de vida.

5.5.2. Objectiu secundari: determinació dels paràmetres associats a la presència d'hiperlactacidèmia en ambdós grups així com la seva relació amb el neurodesenvolupament.

5.6. Tipus d'estudi: Estudi clínic comparatiu de cohorts prospectives.

5.7. Selecció de pacients:

5.7.1 Inclusió: cohort exposada: tots els nadons nascuts consecutivament al nostre centre durant el període d'estudi fills de mares VIH positives exposats (es descarta la infecció seguint les recomanacions nacionals del moment amb posterior comprovació de la seroreversió) a tractament antiretroviral matern durant la gestació i a AZT o triple teràpia durant les quatre o sis primeres setmanes de vida

Cohort de comparació: tots els nadons nascuts consecutivament al nostre centre durant el període d'estudi fills de mares VHC positives sense cap exposició a tractament antiretroviral.

S'escollí aquest grup control per compartir, en teoria, la majoria de característiques tant maternes com obstètriques i neonatals a excepció de l'exposició a ARV, i així evitar, en el possible, els biaixos

5.7.2. Exclusió: nounats infectats pel VIH; fills de mare VIH que no hagi rebut tractament antiretroviral durant la gestació, pacients que es traslladen a d'altres centres durant el seguiment o no el completen per d'altres motius i pacients afectes d'altres patologies associades, principalment aquelles que puguin suposar una possible afectació de l'ADN mitocondrial, especialment trastorns metabòlics congènits.

5.8. Variables a estudi:

- Maternes: edat, ètnia, tractament rebut, situació immunològica i virològica al moment del part, coinfeccions virals, abús de tòxics.
- Obstètriques: setmanes de gestació, tipus de part, administració d'AZT intrapart, *score* d'Apgar.
- Neonatals: pes, talla i perímetre cefàlic al néixer, tractament antiretroviral rebut pel nadó, transmissió vertical de VHC i d'altres coinfeccions, desenvolupament psicomotor i manifestacions neurològiques als primers 12 mesos de vida, evolució somatomètrica del nadó i estudis metabòlics als 1, 3, 6 i 12 mesos de vida (pH, lactat i aminoàcids plasmàtics incloent alanina).

L'avaluació del neurodesenvolupament la varen realitzar els pediatres responsables del seguiment d'aquests pacients a les diferents visites programades segons protocol

durant el primer any de vida. Només es derivaren a la Unitat de Neurologia Pediàtrica aquells pacients que presentaren algun tipus d'alteració.

5.9. Anàlisi estadística: es realitza una anàlisi descriptiva de la mostra per a la detecció de valors extrems o erronis i per a la descripció de les variables, mitjançant el càlcul de les proporcions en el cas de les variables discretes i de les mitjanes amb la seva desviació estàndard en el cas de les variables contínues (mediana i rang interquartílic (RIC), en cas de no seguir una distribució normal). A més, es calcularà la incidència d'hiperlactacidèmia en els dos grups analitzats amb el seu interval de confiança al 95% (IC95%). A continuació, s'estudien les relacions entre les variables independents i l'exposició a antiretrovirals mitjançant la prova de Chi al quadrat o del test exacte de Fisher (en el cas de les variables independents discretes) i de la prova de *t* de Student (en el cas de les variables independents contínues), amb un punt de tall per a la significació estadística (*p*) de 0,05 per a ambdues. Es realitza una anàlisi per intenció de tractament en cas de pèrdues importants en el seguiment. La força d'associació de les variables es mesurarà mitjançant Risc Relatiu (RR) i el seu IC95%. La realització de models de regressió logística es considerarà en funció dels resultats obtinguts a l'anàlisi bivariada. L'estudi estadístic descriptiu i analític de les dades obtingudes es realitzarà mitjançant SPSS versió 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

5.10. Tipus i número d'exploracions a realitzar

Es realitza per part d'infermeria extracció per venopunció perifèrica, conjuntament amb els paràmetres analítics establerts en el control habitual d'aquests dos grups de pacients, de mostres d'àcid làctic i aminoàcids plasmàtics.

Aquest fet requereix l'extracció de dos tubs addicionals:

- Tub d'1 ml amb calci iònic per a gasometria venosa.
- Tub amb preparat especial de cromatografia d'1 ml (exacte pel seu pes) per a l'àcid làctic. El transport de la mostra es realitza de forma immediata i en gel directament al laboratori de metabolopaties per al seu processament.
- Tub amb EDTA amb un mínim de 2 ml per a aminoàcids plasmàtics. El transport de la mostra es realitza de forma rutinària a través de laboratoris centrals.

En cap cas aquestes extraccions suposen una altra punció per a aquests pacients i la volèmia extreta pot suposar, com a màxim i en els casos de menor pes a les 6 setmanes de vida, un 1-2% del total, xifres que no suposen cap perjudici per al pacient.

Les mostres es processen al laboratori de metabolopaties segons els procediments habituals (cromatografia líquida per a aminoàcids plasmàtics i determinacions enzimàtiques corresponents per a status redox) i les dades obtingudes s'emmagatzemen a una base de dades creada per a aquest estudi amb la finalitat de generar els presents resultats.

5.11. Aspectes humans. Consentiment informat

A la primera visita de cada pacient (i/o a les següents en cas que el representant legal i/o el facultatiu ho considerin necessari) s'exposen de forma completa les característiques de l'estudi en el que es pretén incloure al pacient i els avantatges i desavantatges que aquest li pot suposar. S'exposa de forma explícita que en cap cas aquestes extraccions suposen una altra punció per al pacient.

Alhora, s'informa que la participació en aquest estudi és voluntària i del dret del pacient (o en aquest cas del seu representant legal) de retirar-se de l'estudi en cas que ho consideri oportú. De la mateixa manera, s'informa que la negació a participar en el

present estudi no suposa cap perjudici per al pacient ni cap canvi en el control rutinari de la seva patologia.

Tenint en compte que es tracta de dades confidencials que afecten no només al pacient sinó moltes vegades també a seva mare (i freqüentment al pare), s'emfatitza la privacitat de les dades obtingudes i la seva utilització amb motius exclusivament mèdics.

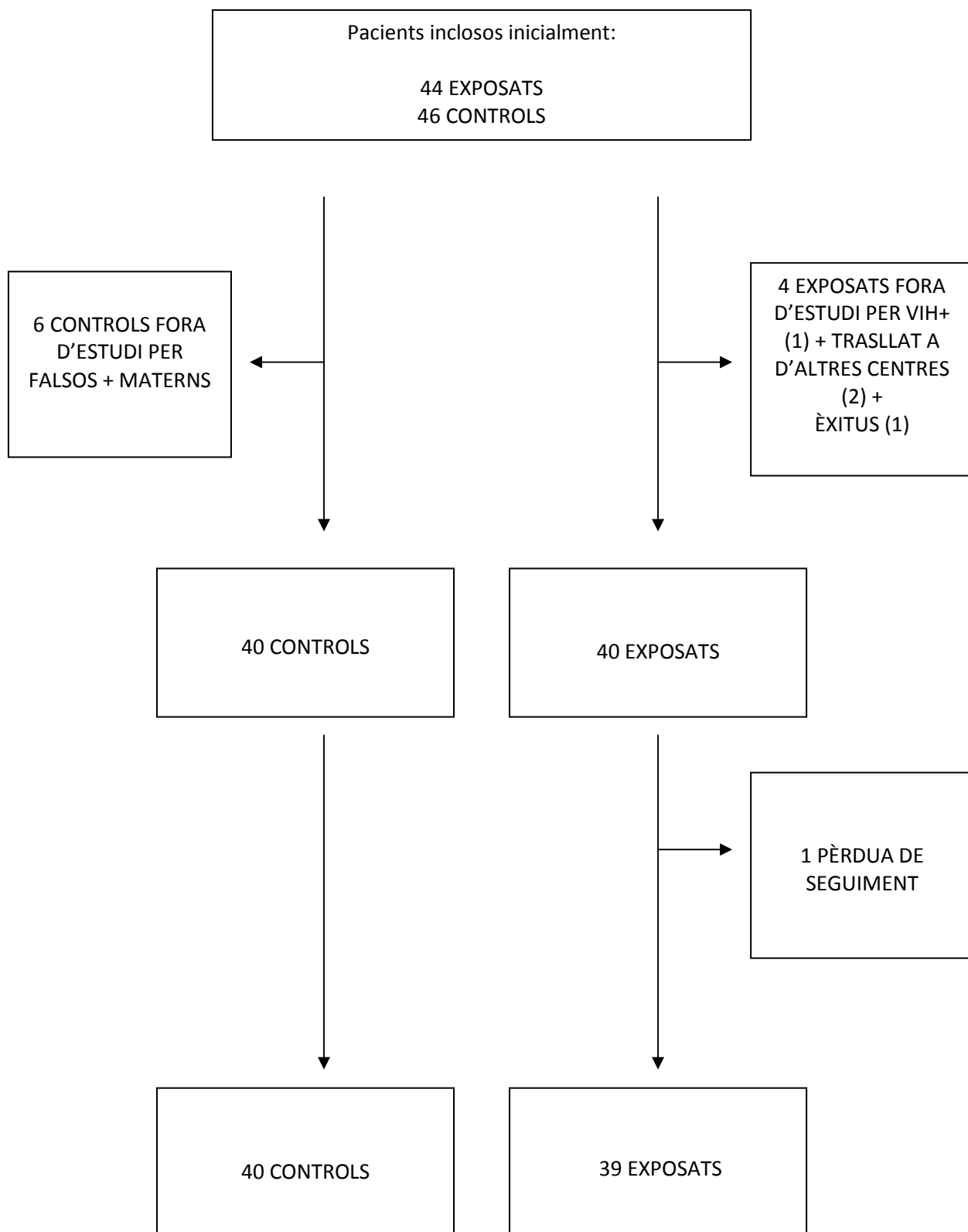
Es va sol·licitar consentiment escrit - sense obviar-se les explicacions verbals necessàries per aquest motiu - a tots els representants legals dels pacients a qui s'ha proposat participar a l'estudi.

El present estudi ha estat aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron amb data 23/12/2005 (número de registre **PR(AMI)137/2005**).

6. RESULTATS

Des d'octubre de 2004 i fins a octubre de 2006 (data d'inclusió del darrer pacient), s'estudiaren un total de 90 pacients, dels que finalment se n'inclogueren 79: 39 a la cohort exposada i 40 a la cohort no exposada.

La inclusió dels pacients va ser consecutiva en base a la data de naixement, sense produir-se cap biaix de selecció. Inicialment, s'introduïren 44 pacients al grup exposat; finalment, però, es redueix a 39 per cinc pèrdues (1 nen amb infecció per VIH de transmissió vertical (pacient número 30), una pèrdua de seguiment als 3 mesos (pacient número 24), 2 trasllats a d'altres centres (pacients números 33 i 34) i 1 èxitus a període neonatal en relació a complicacions d'una hèrnia diafragmàtica esquerra que no es va poder operar (pacient número 43). Inicialment es va introduir 46 pacients al grup control dels que 6 no varen ser inclosos a l'estudi per tractar-se de títols materns d'anticossos front VHC falsament positius durant l'embaràs i no requerir cap tipus de seguiment posterior (**Algoritme 1**).



ALGORITME 1. *Flow chart* d'inclusió de pacients a l'estudi.

6.1. Dades maternes:

6.1.1. Dades de mares d'ambdues cohorts:

- Edat: determinada al moment del part. L'edat mitjana de les mares incloses a l'estudi fou d' aproximadament 32 anys (entre 16 i 41 anys, DS: 4,8), sent lleument superior en el grup control que en el d' exposats (32,9 vs 30,7) unes diferències marginalment significatives ($p:0,052$) (Taula 1 i Figura 2).

	Edat mare	Setmanes de gestació	Pes en nèixer (g)
Mitjana	31,6	37,4	2815,3
Mediana	32,0	38	2890
Mínim	16	28	750
Màxim	41	42	4300
Percentils	25	28	2460
	50	32	2890
	75	36	3220

Taula 1. Edat de les mares, setmanes de gestació i pes al néixer del total de la població estudiada.

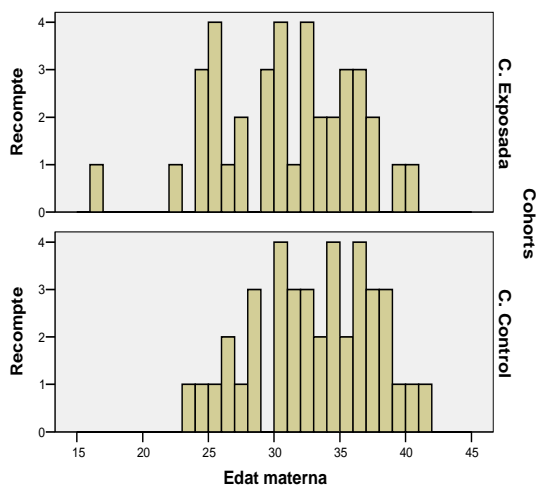


Figura 2. Distribució d'edats maternes (en anys) al moment del part en les dues cohorts.

- Origen ètnic: la majoria de mares eren provinents de l'Europa Occidental (74,6%), gairebé totes elles del nostre país. Hi havia però una sèrie de diferències entre ambdós grups: major número de mares d'origen subsaharià al grup d'exposats (9 i 2, respectivament) i de mares d'origen a l'Amèrica del Sud entre els controls (5 i 2, respectivament) (**Taula 2**). (p: 0,09).

		Ètnia materna					Total
		Europa occidental	Europa de l'est	Amèrica del Sud	Subsahariana	Sudest asiàtic	
Tipus pacient	control	32	0	5	2	1	40
	exposat	27	1	2	9	0	39
	Total	59	1	7	11	1	79

Taula 2. Ètnia materna en ambdós grups.

- Ingesta de tòxics per part de la mare durant la gestació: tot i tractar-se d'una variable a estudi, cal tenir present que les dades s'obtenen a partir de la història clínica, la informació que dóna la mare en ser preguntada, la comprovació de tòxics en orina a mare o nadó en cas de sospita clínica i de l'existència de síndrome d'abstinència - o alteracions neuroconductuals en el cas de consum matern de cocaïna - al nadó. Aquest fet, pot subestimar la prevalença real de toxicomania (incloent tant drogues legals com il·legals).

Així, en un total de 17 gestants (23,9%) (6 pacients al grup control i 11 pacients al grup exposat, sense diferències significatives (p: 0,15)) es comprovà la ingesta d'algun tipus de tòxic (sobretot tabac, metadona i cocaïna esnifada), sent freqüent la politoxicomania.

- Coinfeccions per virus de l'hepatitis: totes les mares del grup de comparació eren, per definició, VHC positives; dues gestants d'aquest grup, a més, presentaven

positivitat de l'antigen de superfície del virus de l'hepatitis B (HbsAg). Quinze de les 39 mares de la cohort exposada (39,5%) estaven coinfectades per VHC, sense trobar-se cap cas de triple infecció materna per VIH-VHC-VHB. No s'estudiaren marcadors d'hepatitis B oculta ni hepatitis C seronegativa a cap dels dos grups.

6.1.2. Dades de les mares de la cohort exposada:

- Tractament antiretroviral de gran activitat (TARGA) durant la gestació: per definició de l'estudi, van rebre tractament antiretroviral totes les mares del grup exposada: 34/39 (87,2 %) TARGA i monoteràpia amb AZT 5/39 (12,8%) (**Taula 3**). En vuit casos consta que es tractaren amb TARGA però no ha estat possible especificar els fàrmacs ARV inclosos al tractament. La **Taula 4** detalla els tractaments rebuts en cada cas. Gairebé un 40% de les gestants varen rebre la combinació AZT, 3TC i nevirapina (NVP). La resta de combinacions foren molt menys habituals. Totes les mares menys una van rebre un NRTi/NtRTi com a part del seu tractament ARV. Agrupant les mares segons l'anàleg de nucleòsid que varen rebre, més d'un 60% van rebre AZT (sumant-hi les 5 mares que van rebre AZT en monoteràpia), aproximadament un 11% d4T i un 8% cap dels dos. No es disposa de dades de l'ús d'anàlegs en un 20%. Només una gestant va rebre ddl durant la gestació. (**Taula 5**). Set gestants varen rebre tractament basat en inhibidors de proteasa, mentre que en 18 era basat en inhibidors de la retrotranscriptasa no anàlegs de nucleòsid (tots ells amb NVP per l'efecte teratogènic d'efavirenz (EFV)- l'única mare que rebé EFV fou per desconeixement de l'estat gravídic i només al primer trimestre, substituint-lo posteriorment per NVP-), sense diferències segons els CD4 materns (**Taula 4**). L'alerta sobre hepatotoxicitat de NVP en gestants amb una bona situació immunològica⁸, feu que els darrers mesos, la majoria

de mares rebessin un tractament basat en LPV/r. Una mare amb $CD4 > 350/mm^3$ tractada amb NVP va presentar una síndrome de Stevens-Johnson greu amb important afectació hepàtica que va requerir ingrés a la Unitat de Cures Intensives, amb bona evolució posterior. No es van constatar altres casos d'hepatotoxicitat en gestants en tractament amb NVP independentment de la seva situació immunològica.

No es disposa de dades sobre la durada del tractament ARV durant la gestació.

	Recompte	Proporció (%)
TARGA si	34	87,2
TARGA no	5	12,8
Total	39	100,0

Taula 3. Administració de TARGA a les gestants del grup exposat.

Tipus de TARGA	Recompte	Proporció (%)
AZT/3TC/NVP	15	38,5
AZT/ddI/NVP	2	5,1
AZT/3TC/LPV-RTV/TDF	2	5,1
AZT/3TC/LPV/RTV	1	2,6
TDF/3TC/NVP	1	2,6
3TC/d4T/LPV/RTV	1	2,6
3TC/ddI/LPV/RTV	1	2,6
ATV/LPV/RTV/T-20	1	2,6
d4T/3TC/NVP	1	2,6
d4T/TDF/3TC/EFV/NVP(*)	1	2,6
TARGA no definit	8	20,5
Monoteràpia amb AZT	5	12,8
Total	39	100,0

Taula 4. Fàrmacs ARV inclosos als règims terapèutics de les gestants de la cohort exposada.

NRTi/NtRTi utilitzat	Recompte	Proporció (%)
AZT en TARGA	20	51,3
d4T	3	10,3
NRTi diferent a AZT i d4T o no NRTi	3	7,7
Monoteràpia AZT	5	10,3
Desconegut	8	20,5
Total	39	100,0

Taula 5. Tractament ARV matern durant la gestació agrupat segons l'anàleg de nucleòsid (NRTi) o nucleòtid (NtRTi) inclòs a la cohort exposada.

- Càrrega viral pre-part: es disposa d'aquestes dades en el 92,3% dels pacients exposats (36/39). Tot i l'alt percentatge de mares que reberen TARGA durant la gestació, només un 54% aproximadament de les gestants presentaren una CV indetectable prèvia al part (**Taula 6**). Entre el grup de les mares amb CV detectable, però, una gran majoria presentaven CV detectables de baix grau i no superiors a 10.000 còpies/ml (amb una mediana de 1600 còpies/ml [rang interquartílic: 925-37.500] en les detectables).

Càrrega viral	Recompte	Proporció (%)
Detectable	15	38,5
Indetectable	21	53,8
Desconeguda	3	7,7
Total	39	100,0

Taula 6. Càrrega viral pre-part de les gestants de la cohort exposada.

- Situació immunològica durant la gestació: es disposa d'aquestes dades també en el 92,3% dels casos. La gran majoria de les gestants presentaven, tot i la dada prèvia de CV, una bona situació immunològica, amb només 8 mares per sota de 350 CD4/mm³ (5 entre 349-200 i 3 per sota de 200 CD4/mm³) (**Taula 7**).

CD4 pre-part	Recompte	Proporció (%)
<200	3	7,7
200-349	5	12,8
350-499	8	20,5
≥500	20	51,3
Desconegut	3	7,7
Total	39	100,0

Taula 7. Limfòcits CD4+ pre-part (en nombres absoluts/mm³) de les gestants del grup exposat.

-Estadiatge clínic de la gestant⁶⁴: tot i que la majoria de mares es trobaven en bona situació immunològica durant la gestació, fins a un 27,2% de les mares estaven classificades com a afectes de síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) per criteris clínics i/o immunològics (**Taules 8 i 9**).

Estadiatge immunològic	Recompte	Proporció (%)
1	14	35,9
2	10	25,6
3	9	23,1
Desconegut	6	15,4
Total	39	100,0

Estadiatge clínic	Recompte	Proporció (%)
A	28	71,8
B	2	5,1
C	3	7,7
Desconegut	6	15,4
Total	39	100,0

Taules 8 i 9. Estadiatge immunològic i clínic de les gestants del grup exposat⁶⁰.

6.2. Dades obstètriques:

- Setmanes de gestació: la majoria dels parts varen ser a terme en ambdós grups. Així, la mediana global va ser de 38 setmanes (RIC 36,2 – 39,3) – 38,8 setmanes en el grup exposat i 38,0 en el grup de comparació - existint diferències significatives entre exposats i controls (**Taula 1 i Figura 3**). ($p < 0,05$).

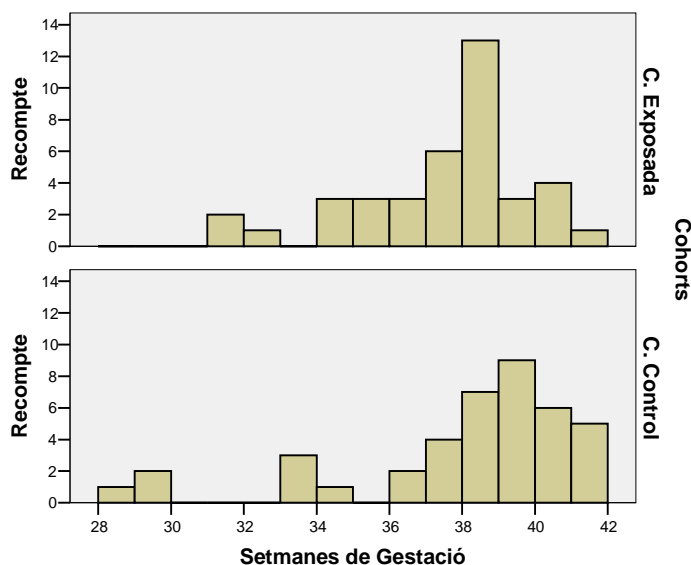


Figura 3. Distribució d'edat gestacional (en setmanes) en les dues cohorts.

- Tipus de part: més de la meitat dels parts varen ser per cesària programada. Es detecten importants diferències en aquest apartat atenent els diferents protocols aplicats a les dues cohorts. Així, mentre la cesària programada suposa un 70,3% dels parts en el grup exposat, només suposa un 25% en el grup de comparació (**Taula 10**) ($p < 0,05$). Cal destacar, però, que un 23,4% dels parts de mares amb infecció per VIH no foren per la via reglada en aquell moment al nostre centre (2004-2006) i que la gran majoria de cesàries programades realitzades al grup de comparació ho foren per motius diferents a la infecció per VHC (només consta aquesta indicació en 2/10 de les cesàries programades realitzades en aquest grup).

		Tipus de part				Total
		Vaginal	Cesària urgent	Cesària programada	Desconegut	
Cohort	Control	23	7	10	0	40
	Exposada	4	7	26	2	39
Total		23	12	43	2	79

Taula 10. Tipus de part en ambdós grups.

- Administració d'AZT IV intrapart: va administrar-se a la pràctica totalitat de les mares del grup exposat (92,3%). No consten els motius pels quals no va administrar-se en els 2 casos restants. En 1 cas no va poder documentar-se amb certesa la seva administració. No es va administrar cap altre ARV a les mares durant el treball de part.

- Avaluació inicial del nadó (score d'Apgar⁶⁵): en ambdós grups, i sense diferències, la gran majoria de pacients (78%) presentaven un Apgar als 1-5 minuts de 9-10 (**Taula 11**). Només 5 pacients presentaren un Apgar inicial menor de 7, i només dos per sota de 7 als 5 minuts.

APGAR 1 min	Recompte	Proporció	Apgar 5 min	Recompte	Proporció (%)
9 ó més	61	78,2	9 ó més	71	89,7
7-9	12	15,4	7-9	5	6,4
<7	5	6,4	<7	2	2,6
Desconegut	1	1,3	Desconegut	1	1,3
Total	79	100,0	Total	79	100,0

Taula 11. Apgar als 1-5 minuts de néixer dels pacients d'ambdós grups.

6.3. Dades dels nens:

- Sexe del pacient: lleu predomini de nenes en la població estudiada (51,3% front 60%), sense diferències entre ambdós grups ($p:0,44$).
- Pes al néixer: la mitjana va trobar-se en tots dos grups per sobre dels 2500 grams sense diferències significatives (2743 gr front 2886 gr; $p: 0,36$) (**Taula 1**).
- Tractament ARV al nadó: es va administrar a la totalitat dels nounats del grup exposat. Així, segons protocol adaptat a les guies del moment, 31 reberen monoteràpia amb AZT i 8 (per tractar-se de pacients amb major risc de transmissió vertical) triple teràpia amb AZT/3TC/NVP (**Taula 12**). La durada total del tractament (no de cadascun dels fàrmacs inclosos) fou de 6 setmanes segons protocol; en 2 casos s'administrà el tractament 2 i 12 setmanes respectivament, per error familiar.

Tractament ARV	Recompte	Proporció (%)
AZT	31	79,5
AZT+3TC+NVP	8	20,5
Total	39	100,0

Taula 12. Tractament antiretroviral rebut pels nadons del grup exposat.

- Transmissió vertical pel VHC: dos dels 16 fills de mare coinfectada VIH-VHC del grup exposat (12,5%), i 2/40 (5%) del grup de comparació foren catalogats d'infecció crònica per VHC (definida com 2 o més determinacions positives d'ARN-VHC o persistència d'anticossos front VHC més enllà dels 24 mesos de vida) (**Taula 13**).

		VHC nen			Total
		si	No	desconegut	
Tipus de pacient	control	2	38	0	40
	exposat	2	14	0	16
Total		4	52	0	56

Taula 13. Estat serològic front VHC dels pacients d'ambdós grups.

Dos pacients del grup exposat presentaven, a més, infeccions connatals per *Treponema pallidum* (lues congènita precoç) i citomegalovirus, respectivament, que es tractaren de forma adequada i no implicaren seqüeles significatives. El pacient amb infecció congènita per citomegalovirus no va presentar afectació neurològica, auditiva ni visual.

- Dades somatomètriques dels nens: es tracta del conjunt de variables amb més dades perdudes (**Taula 14**). Tot i això, les dades són prou completes per a avaluar l'evolució somatomètrica dels pacients d'ambdues cohorts als 6 i 12 mesos d'edat.

	Cas 1 m	Cas 3 m	Cas 6 m	Cas 12 m	Control 1 m	Control 3 m	Control 6 m	Control 12 m
Pes	36/39	31/39	31/39	30/39	26/40	33/40	35/40	31/40
Talla	33/39	31/39	31/39	30/39	27/40	33/40	34/40	30/40
PC	30/39	25/39	26/39	26/39	23/40	27/40	29/40	28/40

Taula 14. Dades somatomètriques disponibles per a cada període i grup.

Tot i trobar-se els valors mitjans de pes, talla i perímetre cefàlic dels pacients d'ambdós grups, tant als 6 com 12 mesos, lleugerament per sota de les corresponents a aquestes edats a la nostra població⁶⁶, els resultats queden inclosos als intervals de normalitat (**Taules 15, 16 i 17 i Figures 4, 5 i 6**), mantenint-se aquesta distribució quan se separen els pacients segons sexe. D'especial interès per al present estudi, són les

dades de perímetre cefàlic, que són normals als 6 i 12 mesos tant al grup de controls com al d'exposats.

Cohorts		1 mes	3 mesos	6 mesos	12 mesos
C. Control	Mediana	4.330	5.500	7.200	9.000
	Minim	1.090	3.170	5.320	6.780
	Màxim	6.450	7.200	8.620	11.100
C. Exposada	Mediana	4.095	5.870	7.430	9.600
	Minim	2.040	3.640	5.300	7.030
	Màxim	5.590	7.510	10.630	13.100
Total	Mediana	4.150	5.665	7.275	9.320
	Minim	1.090	3.170	5.300	6.780
	Màxim	6.450	7.510	10.630	13.100

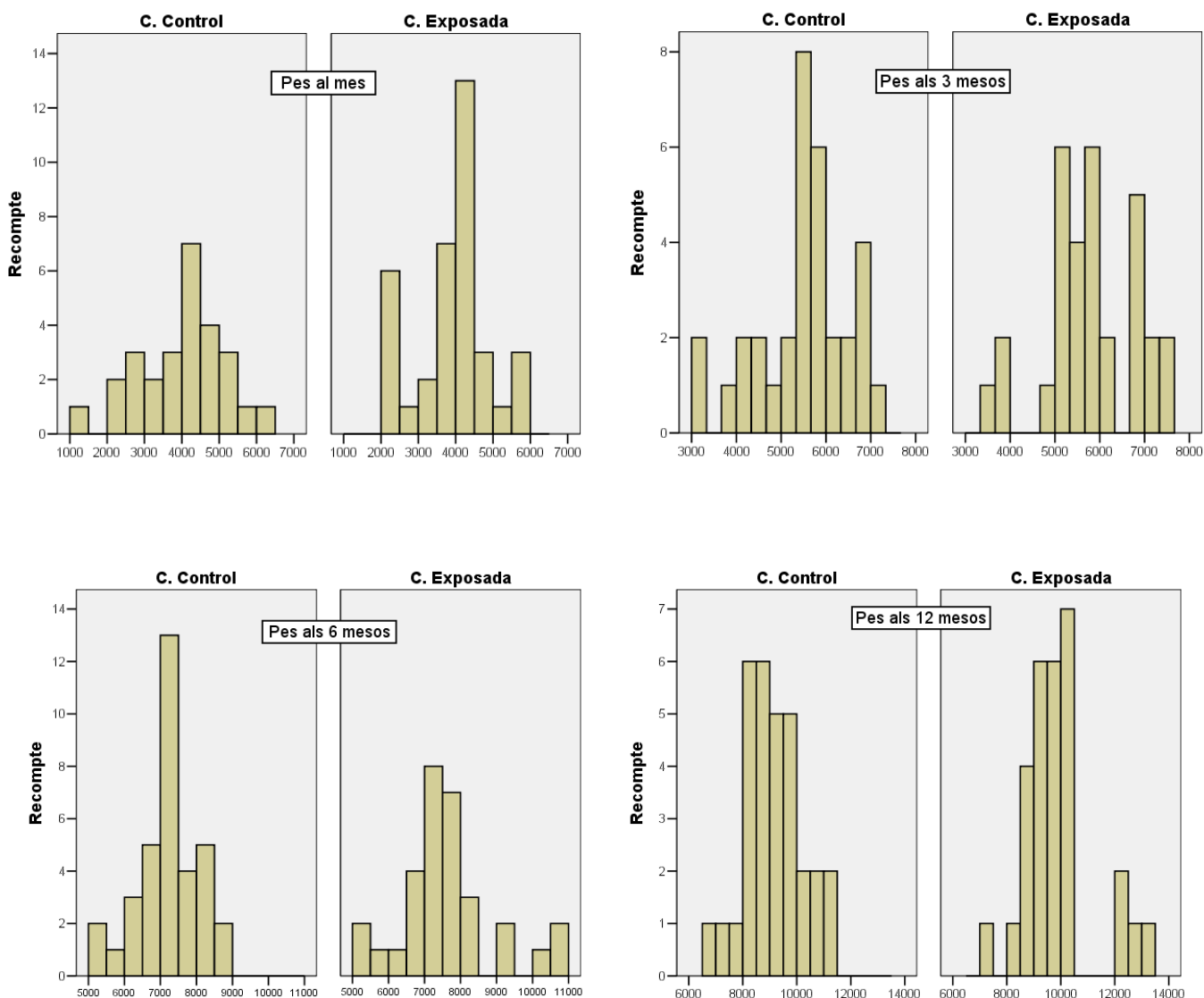
Taula 15. Evolució del pes (en grams) dels pacients d'ambdós grups.

Cohorts		1 mes	3 mesos	6 mesos	12 mesos
C. Control	Mediana	55,5	59,3	67	74,3
	Minim	43	48,5	57,5	67
	Màxim	58,5	68,5	73	87
C. Exposada	Mediana	52	59	65,5	74
	Minim	44,5	51,5	57	67
	Màxim	57	65	74	81
Total	Mediana	53	59	66,5	74
	Minim	43	48,5	57	67
	Màxim	58,5	68,5	74	87

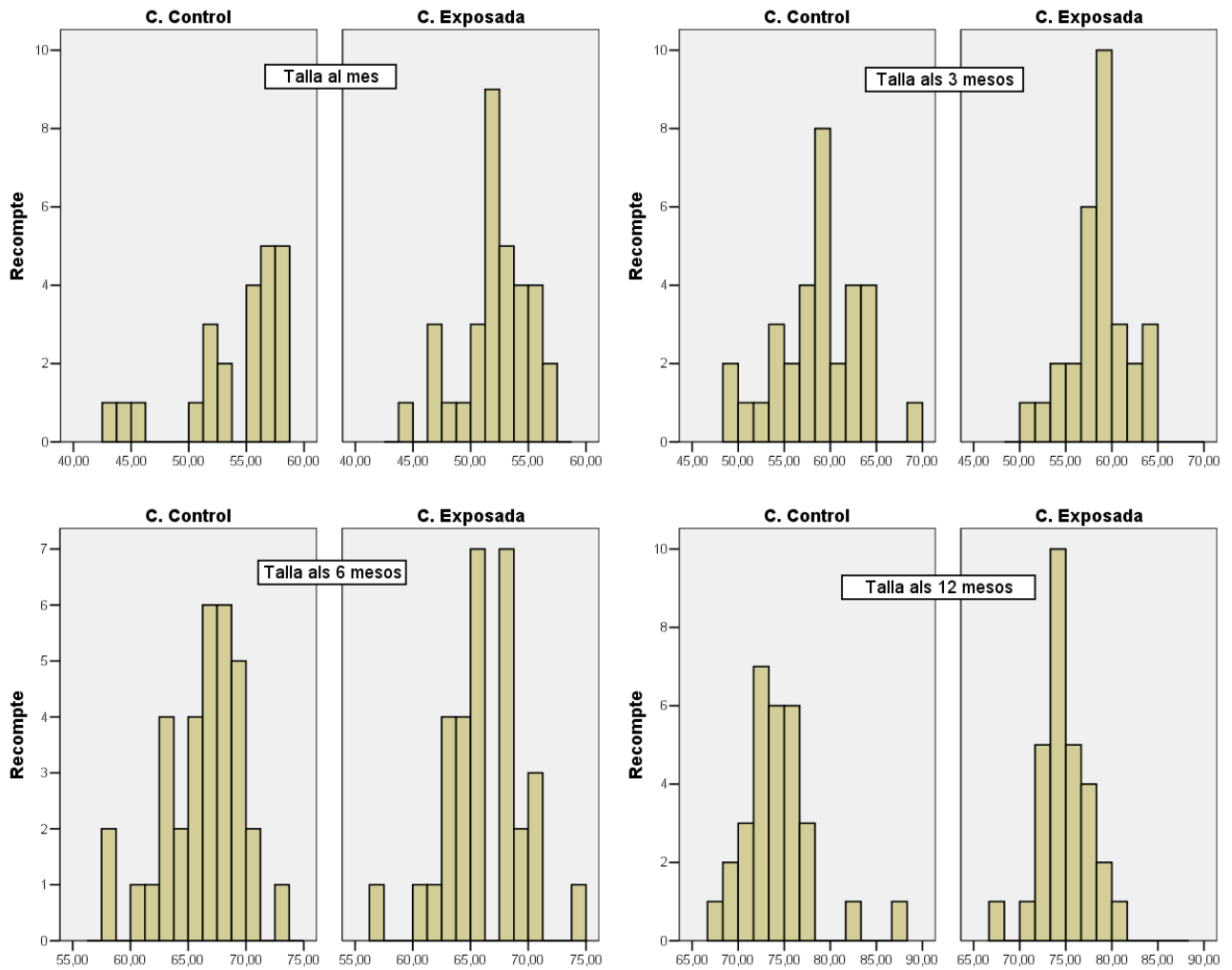
Taula 16. Evolució de la talla (en centímetres) dels pacients d'ambdós grups.

Cohorts		1 mes	3 mesos	6 mesos	12 mesos
C. Control	Mediana	37,3	40	44	46
	Minim	33	36,5	40	42,5
	Màxim	41,5	42,5	46	48,5
C. Exposada	Mediana	36,5	40	43,5	46,5
	Minim	32	36	40,5	43,5
	Màxim	40	43	46,5	49,5
Total	Mediana	37	40	43,5	46
	Minim	32	36	40	42,5
	Màxim	41,5	43	46,5	49,5

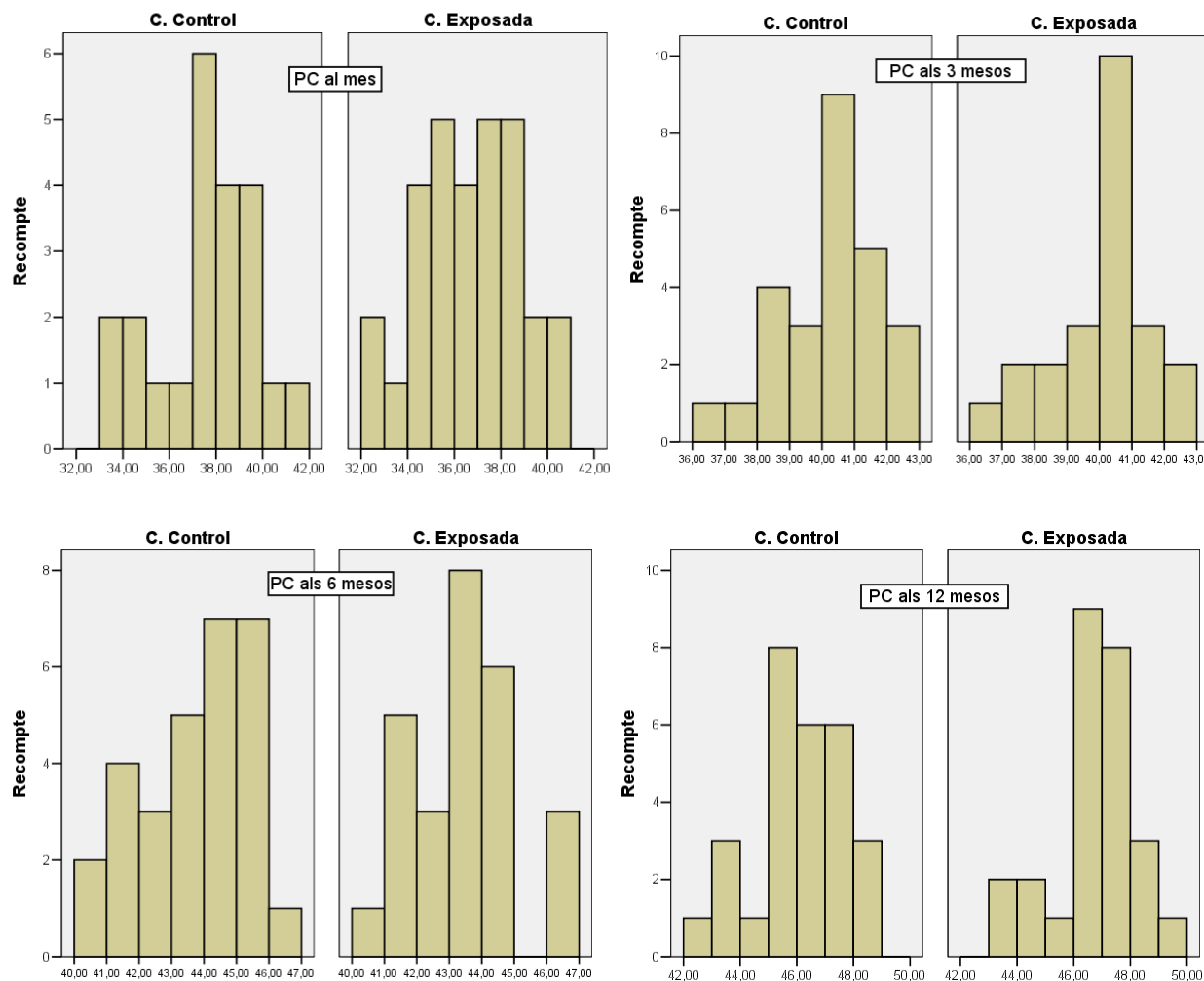
Taula 17. Evolució del perímetre cranial (en centímetres) dels pacients d'ambdós grups.



Figures 4 (a, b, c, d). Distribució de pes dels pacients segons grup i moment de l'estudi (mes, tres mesos, sis mesos i 12 mesos).



Figures 5 (a, b, c, d). Distribució de la talla (en centímetres) dels pacients segons grup i moment de l'estudi (mes, tres mesos, sis mesos i 12 mesos).



Figures 6 (a, b, c, d). Distribució del perímetre cranial (en centímetres) dels pacients segons grup i moment de l'estudi (mes, tres mesos, sis mesos i 12 mesos).

En quant a la comparació de dades somatomètriques entre les dues cohorts, el pes dels pacients del grup de comparació és lleugerament inferior al del grup exposat tant als 6 com 12 mesos, no assolint aquesta diferència significació estadística als 6 mesos ($p: 0,19$) però sí als 12 mesos ($p < 0,05$; mediana grup exposat: 9600 gr, mediana grup de comparació 9000 gr). No existeixen diferències de talla i perímetre cefàlic entre ambdós grups.

- Manifestacions neurològiques durant els primers 12 mesos de vida: 12 pacients (5 a la cohort exposada i 7 a la cohort control) van presentar algun tipus de trastorn neurològic que va obligar a derivar a aquests pacients al neuròleg pediàtric i/o realitzar noves proves complementàries, sense existir diferències entre ambdós grups (p: 0,49) (Taules 18 i 19).

Manifestacions neurològiques	Recompte	Proporció (%)
Si	12	15,2
No	66	83,5
Desconegut	1	1,3
Total	79	100,0

	Manifestació clínica	Factors de risc associats
Cohort exposada	Hipertonia EEII	Tòxics a embaràs
	Hipertonia EEII	No
	Hipertonia EEII	Tòxics a embaràs
	Hipertonia EEII (72)	Prematuritat (34 sG) + tòxics
	Hipotonia axial	Tòxics a embaràs
Cohort de comparació	Nistagmus bilateral + microcefàlia (1)	Tòxics a embaràs
	Hipoacúcia bilateral (7)	Prematuritat (34 sG) + tòxics
	Hipotonia axial	Tòxics a embaràs
	Hipertonia EEII	Prematuritat (29 sG)
	Síndrome d'abstinència	Tòxics a embaràs
	Hipertonia generalitzada	Prematuritat (28 sG)
	Hipertonia EEII (37)	Asfíxia perinatal

Taules 18 i 19. Manifestacions neurològiques dels pacients d'ambdós grups.

- Desenvolupament psicomotor als 12 mesos de vida: un total de 4 pacients (5,1%) (1 a la cohort exposada i 3 a la cohort control) presentaven un desenvolupament psicomotor amb deficiències en l'adquisició d'ítems respecte al considerat com a normal per aquesta edat, sense diferències significatives entre el grup exposat i el de comparació (p: 0,34) (**Taula 20**).

	Recompte	Proporció (%)
Normal	73	92,4
Anormal	4	5,1
Desconegut	2	2,5
Total	79	100,0

Taula 20. Desenvolupament neurològic dels pacients d'ambdós grups.

A continuació, es descriuen en detall les principals característiques d'aquests 4 pacients:

- Cohort exposada (pacient número 72): nen prematur fruit d'una gestació de 34^{5/7} setmanes. Es constata ingesta de tòxics per part de la mare durant la gestació. Durant el primer any va presentar una hipertonia de predomini a EEII, macrocefàlia amb fenotip peculiar i retard psicomotriu que persistia als 12 mesos. Es constata hiperlactacidèmia sense acidosi làctica que no es manté en el temps. No s'han realitzat altres estudis complementaris per part de neurologia pediàtrica. L'evolució posterior del pacient, ja fora d'estudi, ha estat satisfactòria amb un desenvolupament totalment normal a l'actualitat (actualment té 3 anys).
- Cohort de comparació: dels 3 casos amb retard psicomotriu als 12 mesos del grup de controls, la primera (pacient número 7) és una nena prematura de 34^{5/7} setmanes de gestació amb pes adequat a edat gestacional, part vaginal i Apgar 10/10. Es constata

ingesta materna de tòxics durant l'embaràs. Presenta un retard psicomotriu amb microcefàlia, que és catalogat com a multifactorial (tòxic i genètic) per part d'especialistes en neurologia pediàtrica. Els estudis realitzats (estudi metabòlic, TC cerebral, cariotip i potencials evocats auditius) han estat normals. A l'actualitat la pacient té 5 anys i manté un retard en l'adquisició de la parla.

La segona pacient és una nena nascuda d'una gestació a terme (pacient número 37). No consta ingesta de tòxics durant l'embaràs. Secundàriament a una asfíxia perinatal per ruptura uterina, la pacient presenta una encefalopatia neonatal grau II amb afectació de ganglis de la base a la RM cerebral realitzada. Presenta, alhora que un retard en l'adquisició dels ítems corresponents a l'edat, una hipertonia de predomini a extremitats inferiors. A l'actualitat, tot i una evolució acceptable, persisteixen importants alteracions del llenguatge.

Finalment, el tercer pacient del grup de comparació (pacient número 1), és una nena fruit d'una gestació mal controlada a terme amb consum de múltiples tòxics per la mare (alcohol, metadona, cocaïna esnifada i benzodiazepines) amb síndrome d'abstinència greu al període neonatal, que presenta una microcefàlia, nistagmus bilateral i retard psicomotriu que es consideren secundaris a la politoxicomania materna durant la gestació. La RM cerebral, l'estudi metabòlic i els potencials visuals realitzats han estat normals.

- Estudis metabòlics: dels 316 estudis metabòlics esperats, es disposa de resultats complets en 246 (70 determinacions perdudes (22%), **Taula 21**). Les dades es distribueixen de la següent manera:

- Lactat: 265 dades obtingudes (83,9%)

- Alanina: 260 dades obtingudes (82,3%).

Els principals motius de pèrdua de dades foren:

- No assistència del pacient: 13.
- Problemes en l'extracció o processament tècnic: 42.
- Dificultat d'accés venós: 15.

	Cas 1 m	Cas 3 m	Cas 6 m	Cas 12 m	Control 1 m	Control 3 m	Control 6 m	Control 12 m
Lactat	34/39	36/39	33/39	31/39	30/39	33/39	35/39	33/39
Alanina	33/39	33/39	32/39	31/39	31/39	34/39	34/39	32/39

Taula 21. Determinacions metabòliques disponibles per a cada període i grup.

Es va detectar un augment de lactat patològic (major a 2.1 mmol/L) fins en un 91% de pacients en alguna de les determinacions realitzades (72 pacients), disminuint aquesta xifra a un 57% (45/79) dels pacients quan es considerà com a hiperlactacidèmia aquella que s'acompanyava en la mateixa determinació d'una elevació d'alanina plasmàtica superior a 435 micromols/L.

No es van trobar diferències entre ambdós grups, pertanyent 22 pacients a la cohort exposada i 23 a la cohort de control, el que suposa un 56,4% (IC95% 39,6-72,2) i un 57,5% (IC95% 40,9-73,0) dels subtotals corresponents (p: 0,92) (**Taula 22**). Tenint en compte que certs pacients van presentar més d'una determinació alterada, el total de determinacions patològiques va ser de 39 en el grup exposat i 35 en el grup de control.

		Hiperlactacidèmia n (% respecte tipus de pacient)		Total
		Si	No	
Tipus de pacient	Control	23 (57,5)	17 (42,5)	40
	Exposat	22 (56,4)	17 (43,6)	39
Total		45 (57)	34 (43)	79

Taula 22. Presència d'hiperlactacidèmia durant tot el període de seguiment segons cohort d'estudi.

On sí es va detectar una diferència significativa va ser en la distribució temporal de les determinacions alterades, sent més freqüent al grup exposat a la determinació del mes de vida ($p: <0,05$) i al grup control als 12 mesos ($p: <0,05$). No s'observaren diferències significatives als 3 i 6 mesos de vida ($p: 0,17$ i $p: 0,42$ respectivament) (Taula 23 i Figura 7).

	Presència d'hiperlactacidèmia							
	1 mes		3 mesos		6 mesos		12 mesos	
	n (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	n (%)	p
Cohorts								
C. Control	8 (26,7)	<0,05	7 (21,2)	0,17	8 (23,5)	0,42	12 (37,5)	<0,05
C. Exposada	19 (57,6)		12 (36,4)		5 (15,6)		3 (10,3)	
Total	27 (42,9)		29 (28,8)		13 (19,7)		15 (24,6)	

Taula 23. Presència d'hiperlactacidèmia segons cohort d'estudi i moment d'estudi.

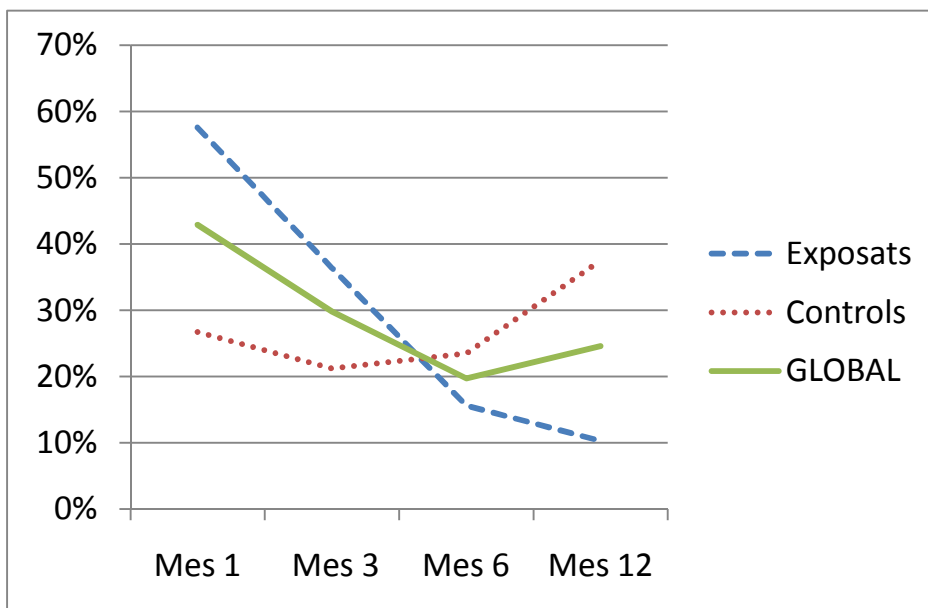


Figura 7. Evolució en el temps de la presència d'hiperlactacidèmia amb hiperalaninèmia en ambdues cohorts.

La **Figura 8** mostra l'evolució de les medianes dels valors de lactat en aquells pacients d'ambdós grups que presentaven hiperlactacidèmia amb hiperalaninèmia en cadascun dels controls. S'observa un patró estable al grup control i una descens constant en el grup d'exposats.

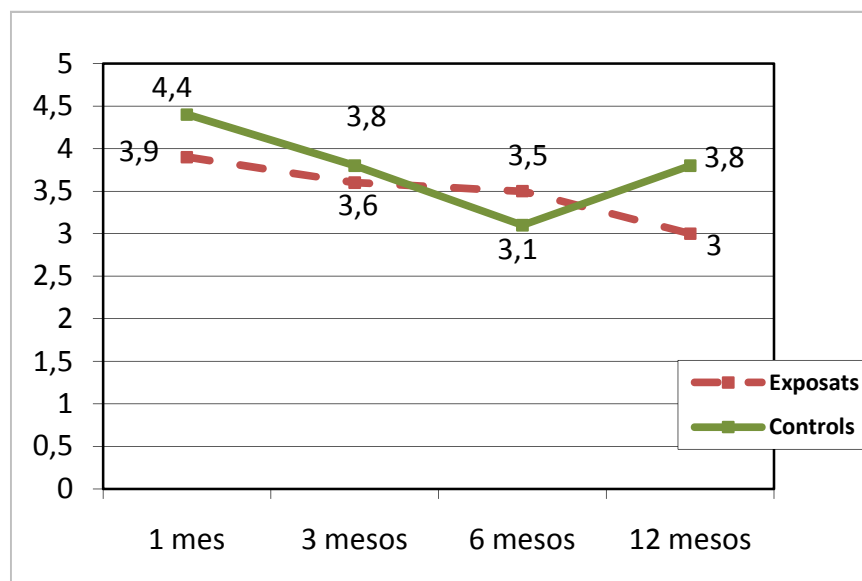


Figura 8. Evolució en el temps de la mediana dels valors d'àcid làctic en els pacients amb hiperlactacidèmia amb hiperalaninèmia en ambdues cohortes.

No es va constatar cap cas d'acidosi làctica (aquella definida com hiperlactacidèmia i un pH venós < 7,20).

Es va realitzar una anàlisi entre les diferents variables potencialment associades amb la presència d'hiperlactacidèmia (ètnia materna, consum de tòxics per part de la mare durant la gestació, valor de la puntuació d'Apgar als 1 i 5 minuts de néixer com a marcador de patiment intrapart, pes al néixer i prematuritat), trobant-se només una associació entre prematuritat i presència d'hiperlactacidèmia (**Taula 24**). Atesa la diferent distribució ètnica d'ambdós grups (major número de mares d'origen subsaharià al grup exposat i de mares d'Amèrica del Sud al grup control) es va realitzar de nou l'estudi comparatiu d'incidència d'hiperlactacidèmia limitat a les mares autòctones, persistint l'absència de diferències entre ambdós grups (18/32 pacients del grup control i 13/27 pacients del grup cas presentaren hiperlactacidèmia en alguna determinació (p: 0,53)).

		Hiperlactacidèmia n (% respecte tipus de pacient)		Total
		Si	No	
Tipus de pacient	Prematur	16 (76,2)	5 (23,8)	21
	A terme	30 (51,7)	28 (48,3)	58
Total		46 (58,2)	33 (41,8)	79

Taula 24. Presència d'hiperlactacidèmia segons prematuritat

Es varen estudiar les variables associades a la variable resposta en el grup exposat. Així, es van avaluar la relació entre variables com la presa de TARGA per part de la mare durant la gestació i els tipus d'ARV que aquesta incloïa, la malaltia avançada catalogada com a SIDA en les gestants, els CD4 i la càrrega viral pre-part o la presa d'ARV per part del nadó a les primeres 6 setmanes de vida amb la presència d'hiperlactacidèmia al nen, sense identificar-se cap factor de risc estadísticament significatiu (**Taula 25**).

Atès que, com s'ha comentat abans, el principal problema relacionat amb la detecció d'hiperlactacidèmia és el risc d'alteracions neurològiques, retard psicomotor i mort prematura, es va avaluar la relació entre la presència d'aquestes i d'hiperlactacidèmia tant en el conjunt de pacients com en el grup exposat, per tractar-se del grup potencialment de major risc.

Variables estudiades		Hiperlactacidèmia n (% respecte valor de variable)		<i>p</i>
		Si	No	
TARGA matern	Sí	21 (60)	14 (40)	0,55
	No	2 (50)	2 (50)	
ARV matern	AZT	14 (70)	6 (30)	0,19
	D4t	3 (75)	1 (25)	
	Altres o desconegut	6 (40)	9 (60)	
SIDA matern	Sí	5 (55,6)	4 (44,4)	0,91
	No	14 (58,3)	10 (41,7)	
CD4	<200	1 (33,3)	2 (66,7)	0,37
	200-350	3 (60)	2 (40)	
	350-500	7 (87,5)	1 (12,5)	
	>500	10 (50)	10 (50)	
Càrrega viral	Detectable	10 (66,7)	5 (33,3)	0,55
	Indetectable	12 (57,1)	9 (42,9)	
Tractament neonatal	AZT	18 (58,1)	13 (41,9)	0,58
	AZT+3TC + NVP	5 (62,5)	3 (37,5)	

Taula 25. Presència d'hiperlactacidèmia en funció de les principals variables estudiades.

Així, només 3 dels 13 pacients (23%) que en algun moment van presentar manifestacions neurològiques i 2 de 4 (50%) amb alteració del desenvolupament psicomotor, van presentar alguna determinació d'hiperlactacidèmia. D'aquests darrers, el pacient cal grup d'exposats (pacient número 72) va presentar una hiperlactacidèmia mantinguda fins als 6 mesos d'edat que no es presenta en controls posteriors i els tres pacients del grup control presenten patrons diferenciats (tot i no disposar de dades als 3 i 6 en dos d'ells). La pacient número 1 presenta una

hiperlactacidèmia als 12 mesos que no presentava al mes de vida, la pacient número 7 no presenta hiperlactacidèmia ni al mes ni als 12 mesos i la pacient número 37 (afecta d'asfíxia perinatal) no presenta hiperlactacidèmia en cap de les quatre determinacions (**Taula 26**). Curiosament, es va detectar una major freqüència d'hiperlactacidèmia en pacients sense manifestacions neurològiques ($p < 0,05$), possiblement en relació a la diferència de pacients amb i sense afectació neurològica. A més, cap dels pacients que varen presentar manifestacions neurològiques ni retard psicomotor va presentar una hiperlactacidèmia mantinguda ni ha estat catalogat com a afecte d'una mitocondriopatia per part dels especialistes en neurologia pediàtrica.

Pacient	Grup	Mes 1	Mes 3	Mes 6	Mes 12
Pacient 72	Cas	+	+	+	-
Pacient 37	Control	-	-	-	-
Pacient 1		-	NR	NR	+
Pacient 7		-	NR	NR	-

Taula 26. Presència (+) o absència (-) d'hiperlactacidèmia amb hiperalaninèmia en els pacients amb retard psicomotor. *NR: no realitzat.*

Aquestes dades es mantenen quan es limita l'estudi a la cohort exposada, presentant hiperlactacidèmia en algun moment un 20% (1/5) dels que presentaren algun tipus de manifestació neurològica. Com ja s'ha comentat, el cas amb retard psicomotor als 12 mesos va presentar una hiperlactacidèmia no mantinguda, sense acidosi i amb bona evolució neurològica posterior.

Tots els nens inclosos, que en el moment de finalitzar l'estudi tenien una edat mediana de 2,6 anys (rang interquartílic: 2,2-3,2) i en el moment de redactar-se el document de 4,7 anys [rang interquartílic. 4,4-5,4], estan vius.

7. DISCUSSIÓ

El present treball detecta una incidència significativa d'hiperlactacidèmia asimptomàtica durant el primer any de vida en una cohort de fills de mare VIH exposats a ARV tant pre com intra i post-part. Tot i això, aquesta incidència és pràcticament idèntica en una població de fills de mare amb infecció pel VHC que comparteix la majoria de característiques exceptuant l'exposició al VIH i als ARV.

És destacable la coincidència de dades epidemiològiques maternes amb cohorts molt més àmplies tant del nostre medi com de fora. Així, tant els treballs recents de Noguera et al⁶³, Rojano et al⁶ o Fernández-Ibieta et al²⁴, tots ells al nostre medi, com el d'Alimenti et al⁶⁷ a Canadà, presenten una població materna amb característiques molt similars a la presentada en aquest treball. En tots ells, l'edat mediana de les mares amb infecció per VIH supera els 30 anys i la gran majoria d'elles són caucàsiques. L'exposició a tòxics en aquests treballs també és elevada i s'estima del 20%²⁴, 40%⁶³ o fins el 52%⁶⁷, segons el treball.

De la mateixa manera la cohort de fills de mare VIH de Catalunya (projecte NENEXP) que inclou més de 800 parelles mare-nen també presenta dades similars amb una edat materna al part superior als 30 anys, d'ètnia predominantment caucàsica i una incidència d'ingesta de tòxics durant la gestació de fins a un 46% (dades no publicades).

El treball més important realitzat a països en vies de desenvolupament que tracta del risc d'hiperlactacidèmia a fills de mare amb VIH⁶⁸, no descriu les característiques de les mares dels nadons estudiats.

Les dades que recullen la ingesta de tòxics durant l'embaràs s'han de valorar amb cura ja que no es realitza un despistatge universal d'aquesta dada en cap dels treballs i les dades s'obtenen a partir de la informació que dóna la mare, la comprovació de tòxics en orina a mare o nadó en cas de sospita clínica i l'existència de síndrome d'abstinència – o trastorns neuroconductuals en el cas de consum matern de cocaïna - al nadó. Aquest fet de ben segur que subestima la prevalença real de toxicomania i justifica les diferències observades entre els diferents treballs, com descriu el treball de García-Algar et al⁶⁹ en una població de risc del nostre medi que demostra una infravaloració utilitzant els mètodes habituals de 5-10 vegades respecte a l'anàlisi a meconi. Tot i aquest probable infradiagnòstic de la ingesta de tòxics durant la gestació, la majoria de treballs coincideixen en que són percentatges superiors al de la població general femenina en edat reproductiva⁷⁰.

Així mateix, les característiques de les mares amb infecció per VHC, a més de ser superposables a les de la cohort exposada, són comparables a les presentades en treballs realitzats al nostre medi. Vilagrasa et al, recullen un total de 133 parelles mare-fill en un únic centre durant un període de 7 anys (dades no publicades): en aquest treball es presenta una població materna amb edat mediana de 33 anys, a la que fins un 25% de les mares refereix l'antecedent d'administració de drogues per via parenteral i un 26,2% presenten coinfecció per VIH. De la mateixa manera, Claret et al⁷⁰ en una sèrie de 128 de parelles mare-fill presenta unes dades totalment superposables a les mostrades anteriorment (a excepció d'un percentatge menor de mares coinfectades pel VIH -14%-). El treball de Noguera et al⁶³, presenta uns resultats

sorprenentment alts de coinfecció per VHC a la població de mares estudiades, amb taxes de coinfecció superiors al 40% i una transmissió vertical de VHC d'un 15%.

La transmissió vertical del VHC fou del 5% al grup de mares monoïnfectades pel VHC i del 12,5% al grup de mares coinfectades pel VIH i pel VHC, dades similars a les presentades a l'estudi de Vilagrasa et al realitzat al nostre centre entre els anys 2000-2007 (10%, dades no publicades) o a l'estudi de Claret et al (16,7%)⁷¹. El seguiment per protocol clínic fins als 5 anys (grup exposat) i fins a negativització dels anticossos front VHC (grup de comparació), permeté extreure aquestes dades més enllà dels 12 mesos de seguiment inclosos en el present estudi.

En quant a les dades pròpiament relacionades amb la infecció pel VIH i l'exposició a ARV, limitada evidentment a les mares del grup d'exposats, de nou les característiques del present estudi són superposables als estudis comparats anteriorment. Així, al treball de Noguera et al⁶³, aproximadament un 9% de les mares van rebre monoteràpia amb AZT i un 85% TARGA, mentre que un 6% no en va rebre (dada que les exclouria del nostre estudi). El treball de Fernández-Ibieta et al²⁴, tot i realitzar-se aproximadament en el mateixos anys (2000-2005), inclou un menor número de mares en monoteràpia. Alimenti⁶⁷ et al no detallen el tractament ARV rebut per les mares durant la gestació tot i dir que el van rebre 35/38 mares estudiades. La gran majoria de règims combinats d'ARV inclouen com a un dels seus NRTi, AZT - sobretot conjuntament amb 3TC - tant en el nostre treball com en els abans citats^{24,63,67}.

A la cohort del projecte NENEXP, un 82% (410/502) de les mares que van rebre tractament ARV durant la gestació van rebre TARGA mentre que un 18% van rebre

mono o biteràpia amb NRTI (dades no publicades), resultats de nou molt similars al del present treball.

Amb les dades descrites prèviament es posa de manifest que la representativitat (validesa externa) de la mostra estudiada sembla elevada.

S'ha d'entendre l'ús de monoteràpia amb AZT pel període de temps (2004-2007) en que es realitzà el treball. Així, mentre les guies actuals recomanen l'ús de tractament combinat en tots els casos, limitant la monoteràpia amb AZT casos concrets amb càrrega viral inferior a 1000 còpies/ml⁸, les guies del moment contemplaven aquesta opció en un ventall més ampli de situacions⁷². També és en aquest sentit que cal entendre l'elevat percentatge de mares que varen rebre tractament amb NVP independentment del seu recompte de CD4, ja que la primera publicació que alertava del seu ús en gestants amb CD4 > 250/mm³ data de desembre de 2004, quan l'estudi ja s'havia iniciat⁷³. Respecte a la proporció de mares que reben IP o NNRTI com a part del seu règim ARV, les dades presentades en aquest treball coincideixen amb les publicades per Noguera et al⁶³, Fernández-Ibieta et al²⁴ i Alimenti et al⁶⁷ i amb les de la cohort NENEXP (38,3% IP i 60,5% NNRTI).

Respecte a la situació immunoviològica de les gestants, s'observa que tot i que la gran majoria es troben en una situació d'immunosupressió lleu, només s'aconsegueix CV indetectable prepart en un 54% dels casos. Tot i ser cert que la majoria de mares amb CV detectable presentaven CV de baix grau (mediana de 1.600 còpies/ml), això s'allunya de l'objectiu primer per a evitar la transmissió del virus. Tot i que aquestes dades no difereixen de treballs del nostre medi com el de Fernández-Ibieta et al²⁴ (50% de mares presenten una CV prepart indetectable) són pitjors que els d'Alimenti et al⁶⁷

a Canadà (32/38 mares amb CV indetectable prepart) i no cal oblidar que aquest és un dels principals factors de risc de transmissió vertical del virus¹¹ i cal dedicar els màxims esforços per a millorar aquesta situació.

Tot i que cohorts més àmplies i que inclouen nens nascuts abans de 2004 descriuen una major incidència de prematuritat en els fills de mare VIH ^{21,74,75}, aquesta dada no es confirmà a la nostra mostra amb una edat gestacional mitjana de 38,8 setmanes (similar a la publicada per altres sèries al nostre medi²⁴) i amb diferències marginalment significatives respecte al grup control. Aquest fet possiblement es relaciona amb un millor control de la malaltia i l'embaràs en aquestes pacients respecte al passat, com descriuen certs estudis, sobretot americans⁷⁶.

Mentre la pràctica totalitat de mares amb infecció per VIH van rebre profilaxi ARV intrapart de forma correcta segons el protocol vigent, les dades sobre la via de part són, si més no, sorprenents. Així, tot i que les recomanacions de valorar individualment la realització de cesària en les mares amb CV menor de 1000 còpies/ml daten de principis d'aquesta dècada^{77,78}, aquesta pràctica no es va posar en pràctica de forma habitual al nostre centre fins l'any 2008. A més, el fet que fins a un 50% de les mares no presentessin una CV indetectable prepart (tot i ser de baix grau), fa pensar que en diversos casos no es va poder oferir la millor via de part per a mare i nadó. Els motius que hi poguessin portar no formen part dels objectius del present treball.

En quant al percentatge de cesàrees al grup de control és més elevat que el recomanat per l'OMS (15%) i superior al global del nostre centre (20%), sense que trobem una explicació concreta a aquest fet.

Tots els nadons fills de mare amb infecció per VIH varen rebre profilaxi amb AZT o tractament combinat amb AZT/3TC/NVP segons recomanacions del moment⁷². Aquestes dades són molt similars a les presentades per Noguera et al⁶³, però difereixen del treball d'Alimenti et al⁶⁷, on cap nen és exposat a triple teràpia al període neonatal (29 van rebre monoteràpia amb AZT i 9 una dosi de NVP postpart).

La mediana de pes al néixer va ser similar a la reportada en diversos treballs del nostre medi^{24,63}, i també a la cohort NENEXP. Tot i trobar-se per sota del pes adequat per a edat gestacional, es troben en els límits de la normalitat (p10 del nen nascut a terme⁶⁶, i p25 per al nen de 38 setmanes de gestació al nostre medi⁷⁹) i sense diferències entre ambdós grups, exceptuant el pes dels 12 mesos, presentant en aquest punt un pes significativament inferior als pacients del grup control. La mediana de pes dels pacients ronda el p25 de la normalitat en les determinacions al mes, 3 mesos i 6 mesos per ambdós grups i als 12 mesos pel grup exposat. El pes als 12 mesos dels controls es trobaria al p10 ($p < 0,05$). En quant a la talla i al PC no hi ha diferències entre ambdós grups en cap de les determinacions. La talla es troba de manera mantinguda al percentil 25, i el perímetre cefàlic sobre el percentil 50⁸⁰.

Així mateix, aquestes dades són superposables a les recentment publicades al nostre país per la Cohort FIPSE de Madrid²⁴ i anteriorment pel col·laboratiu europeu presentat per Newell et al l'any 2003²³.

En quant a les manifestacions neurològiques dels pacients no es varen observar diferències entre ambdós grups. Tot i així, el percentatge de nens que van presentar algun tipus de manifestació neurològica fou elevat en ambdós grups (12,5% en el grup d'exposats i fins a un 17,5% dels no exposats), encara que cap d'ells va presentar

clínica comicial, a diferència del publicat per Landreau- Mascaró et al⁸¹ i catalogat com a possible manifestació de toxicitat mitocondrial. El treball de Bruck et al⁸² realitzat l'any 2001 a Brasil, descriu fins a un 55% de petites alteracions neurològiques en una cohort de 83 nens. Possiblement el seguiment més estricte d'aquest grup de nens fa que es detectin un major número de complicacions transitòries que a la població general. A més, cal tenir present que en tots els casos menys dos, es podien descriure factors de risc associats, sobretot ingesta de tòxics per part de la mare durant la gestació i prematuritat.

Tot i que la gran majoria de manifestacions neurològiques presents a la nostra població foren transitòries, 4 pacients (1 al grup d'exposats i 3 al grup de controls) presentaven un retard psicomotor significatiu a l'any de vida, dels que 3 encara presentaven seqüeles en escriure aquest treball. Cal que tinguem present, però, l'existència de factors de risc no associats al VIH ni al tractament ARV, com la politoxicomania durant l'embaràs en 3 casos i l'asfíxia neonatal en un. Tots aquests pacients varen ser estudiats per la Unitat de Neurologia Pediàtrica i, malgrat el pacient exposat a ARV presentava hiperlactacidèmia amb hiperalaninèmia a les determinacions del primer i tercer mes, es va descartar el diagnòstic de patologia mitocondrial en tots ells. A diferència del publicat per Tardieu et al⁸³, i exceptuant el cas amb l'asfíxia perinatal, les proves de neuroimatge realitzades en aquests pacients varen ser normals.

Un ampli estudi molt recent i que inclou fins a 1840 fills de mare VIH als EUA, no demostra alteració significativa del neurodesenvolupament associada al tractament ARV en aquests pacients als 2 anys mitjançant l'escala de Bailey per al

neurodesenvolupament infantil (BSID)⁸⁴. Estudis més petits, com el d'Alimenti et al²² de 2006, demostren uns resultats inferiors als nens exposats que desapareixen en corregir els resultats segons l'exposició intraúter a tòxics. Aquestes alteracions del neurodesenvolupament sí que es presenten en els nens infectats pel VIH per transmissió vertical com es demostra en d'altres estudis realitzats a països desenvolupats, amb diferències significatives respecte als exposats^{85,62}.

Respecte a la presència d'hiperlactacidèmia i la seva possible relació amb diferents factors de risc cal avaluar inicialment els procediments d'estudi. El motiu per a escollir la determinació de lactat venós com a mètode de cribatge és el fet que es tracta d'una tècnica validada en aquest sentit amb bona correlació amb l'afectació de l'ADN mitocondrial^{86,87}, a més de tractar-se d'una determinació de rutina al nostre centre **(Figura 1)**.

Altres tècniques no invasives com la prova de l'exercici anaerobi a l'avantbraç (*FAET* en les seves sigles en anglès) poden ser d'utilitat però no han estat validades a gran escala i suposen una major complexitat tècnica⁸⁸.

La determinació conjunta d'alanina aporta fiabilitat al diagnòstic d'hiperlactacidèmia mantinguda de manera que obvia els falsos positius provocats per la tècnica d'extracció, manipulació, plor,... freqüents a la pràctica clínica diària, especialment en nens tan petits⁸⁹. Així, del 91% de mostres amb un lactat elevat, es passa a un 57% de casos amb hiperlactacidèmia amb hiperalaninèmia concomitant sense diferències entre grups, dades que contrasten amb les publicades per Noguera et al⁶³, on els casos amb hiperlactacidèmia sense hiperalaninèmia són excepcionals tot i que s'eliminen moltes mostres per extracció/processament inadequats, sense que trobem explicació a

aquestes diferències. Les nostres dades sí que coincideixen amb les d'aquest treball a l'hora de mostrar un descens progressiu de la mediana d'àcid làctic al llarg del primer any de vida a la cohort exposada.

No es va estudiar l'ADN mitocondrial de forma conjunta amb la determinació de lactat i alanina, tot i que hagués pogut aportar més informació a les dades obtingudes i seria una potencial limitació d'aquest treball. De totes maneres, diversos treballs posen en dubte la utilitat d'aquesta determinació per al cribatge de la patologia mitocondrial en aquesta població^{90,91}. Per exemple, Garrabou G et al⁹² indiquen que l'estudi de la funció mitocondrial (replicació, transcripció i/o contingut proteic) presenta millor correlació amb la presència d'hiperlactacidèmia que la pròpia determinació d'ADN mitocondrial per si mateixa. Altres treballs, com el de Mc Comsey et al⁹³, demostren una absència de relació entre la determinació de l'ADN i la funció mitocondrial en fills de mare VIH exposats a ARV.

Des del treball de Blanche et al de 1999⁴², han estat diverses les publicacions sobre el risc d'hiperlactacidèmia com a marcador de dany mitocondrial i les seves conseqüències amb resultats dispars i poc concloents. Així, les dades de la cohort francesa^{94,95}, van en aquesta línia i descriuen dos grups separats d'afectació mitocondrial: hiperlactacidèmia asimptomàtica persistent en el temps però autolimitada i sense conseqüències (aproximadament en un terç dels fills de mare VIH exposats a ARV) i hiperlactacidèmia simptomàtica amb manifestacions neurològiques associades de diversa gravetat (amb una incidència del 0.3–0.5%). Per contra, la majoria de treballs realitzats als EUA, posen en dubte aquesta associació, especialment en quant a les manifestacions neurològiques associades⁹⁶⁻¹⁰⁰. De la mateixa manera

diversos estudis europeus i tailandesos demostren la presència d'hiperlactacidèmia però l'associació amb les manifestacions clíniques i la seva gravetat és molt menys potent que a les publicacions de la cohort francesa^{63,67,101-103}. El que sembla evident és la capacitat dels ARV especialment els anàlegs de timidina de depleccionar l'ADN mitocondrial¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Evidentment, la baixa xifra de pacients del nostre treball impedeix treure conclusions sobre aquesta baixa proporció de casos amb hiperlactacidèmia simptomàtica, en cas que existís.

En aquesta situació el treball que aquí es presenta aporta dades interessants. Així, aproximadament la meitat dels pacients presenten al menys una determinació d'hiperlactacidèmia amb hiperalaninèmia sense diferències entre ambdues cohorts. La distribució de l'aparició d'hiperlactacidèmia sí que varia en funció del temps presentant una corba descendent amb els mesos a la cohort exposada i una corba pràcticament plana a la cohort control (**Figura 6**). Aquests resultats poden estar en relació temporal amb l'exposició a ARV en la cohort exposada i són similars als presentats per Noguera et al⁶³ i Giaquinto et al¹⁰¹. Alimenti et al⁶⁷ aporten dades només fins als 4 mesos d'edat amb una tendència similar a la mostrada a la nostra sèrie. De totes maneres, l'any 2003 Poirier et al¹⁰⁸ presentaren un treball on es demostra la persistència de deplecció de l'ADN mitocondrial fins a l'any de vida.

En quant als factors risc associats a la presència d'hiperlactacidèmia només es va demostrar, a diferència d'altres estudis, una associació estadísticament significativa ($p < 0,05$) amb la presència de prematuritat^{63,67}. Tot i ser freqüentment considerat un bon marcador de dany tisular durant el període neonatal, no hem trobat descrita una

major presència d'hiperlactacidèmia en prematurs en absència de patiment fetal o sèpsia a la literatura revisada, ni a població VIH ni seronegativa.

Per contra, cap dels factors relacionats amb el VIH i el tractament ARV van relacionar-se de manera estadísticament significativa amb la presència d'hiperlactacidèmia a la cohort exposada. Aquestes dades són comparables amb les publicades per Alimenti et al⁶⁷ i contrasten amb les obtingudes per Noguera et al⁶³ que demostren associació entre l'aparició d'hiperlactacidèmia i l'ús de NRTI durant la gestació, especialment si contenia ddl. La pràctica absència de gestants en tractament amb ddl (1/31) impedeix valorar la potencial relació entre el seu ús i l'aparició d'hiperlactacidèmia.

Respecte a la relació entre la presència d'hiperlactacidèmia i l'aparició de complicacions neurològiques, es va detectar sorprenentment una major freqüència d'hiperlactacidèmia en pacients sense manifestacions neurològiques, a diferència del descrit pel grup francès^{42,94,95}. A més, com ja s'ha comentat, cap dels pacients que varen presentar manifestacions neurològiques ni retard psicomotor va presentar una hiperlactacidèmia mantinguda.

Cap dels nostres pacients va presentar acidosi láctica, a diferència de les dades publicades per la cohort francesa⁹⁵, tot i que la baixa incidència descrita i la petita mostra, limiten el valor d'aquesta dada.

No hi va haver cap mort entre els pacients inclosos definitivament a l'estudi (tot i que una pacient va ser exclosa al mes de vida a causa d'una hèrnia diafragmática que li va causar la mort). Aquestes dades, ja als 5 anys, confirmen la millora als darrers anys en quant a supervivència dels fills de mare amb infecció per VIH^{21,109}.

Amb les dades que disposem, cal ser curós a l'hora d'assignar causalitat al tractament antirretroviral i, com afirma una metaanàlisi realitzada l'any 2007¹¹⁰, calen estudis amplis i ben dissenyats per a treure'n l'entrellat. Esperem que l'estudi MITOC i el seu equivalent als EUA donin resposta a moltes de les preguntes que encara queden per resoldre.

Finalment, cal tenir presents treballs recents de farmacogenòmica dels ARV on es posa de manifest l'existència de certs polimorfismes que poden predisposar o protegir front la presentació d'hiperlactacidèmia en pacients que reben aquests fàrmacs^{111,112}. Caldrà avaluar el veritable paper d'aquests polimorfismes en els fills de mare VIH exposats a ARV en cas de confirmar-se una relació directa entre l'ús de certs ARV, la presència d'hiperlactacidèmia i potencials alteracions del neurodesenvolupament.

7.1. Limitacions de l'estudi

Les principals limitacions del present estudi són:

- 1- Petit tamany de la mostra: és evident que el tamany mostral del present estudi pot no permetre detectar els casos d'hiperlactacidèmia simptomàtica greu definida per la cohorte francesa. De totes maneres, com ja s'ha comentat, creiem que l'absència de diferències en les dades basals respecte a cohorts molt més àmplies en valida els resultats.
- 2- Manca d'estudis d'ADN mitocondrial de forma paral·lela als estudis metabòlics: evidentment hagués estat interessant poder comparar les dades d'ambdós paràmetres en els dos grups, però la manca de correlació descrita en alguns treballs i la dificultat en la seva interpretació, ens varen portar a obviar-ne la realització.

3- Per tractar-se d'un treball realitzat des de la vessant pediàtrica de la gestació, no es disposa de certes dades maternes (o si més no, prou detalladament) com l'ús o abús de tòxics, la durada del tractament ARV,... que haguessin pogut aportar dades interessants en l'avaluació de l'alt percentatge de pacients amb hiperlactacidèmia asimptomàtica.

8. CONCLUSIONS

El present estudi aporta noves dades al controvertit tema de la detecció d'hiperlactacidèmia i les seves conseqüències al fill de mare VIH exposat a ARV.

1. Les dades aportades no demostren una associació entre l'ús d'ARV intraúter, intrapart i postpart i l'aparició d'hiperlactacidèmia.
2. Entre tots els factors de risc potencialment associats, només la presència de prematuritat s'associa a una major incidència d'hiperlactacidèmia.
3. No es demostra l'associació entre la presència d'hiperlactacidèmia i l'aparició de simptomatologia neurològica.

Caldrà, doncs, estar molt pendent del resultat dels estudis multinacionals que estan en marxa per a saber l'abast real d'aquesta possible associació.

9. AGRAÏMENTS

Voldria mostrar el meu agraïment a tota aquella gent que m'ha donat suport en el dia a dia de la gestació d'aquesta tesi.

En primer lloc al Prof. Antonio Mur (Servei de Pediatria de l'Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona) i a la Dra. Concepció "Mai" Figueras (cap de la UPIIP) per la direcció del treball i servir de guia en la seva realització.

A l'Ana Álvarez, infermera del nostre Hospital de Dia, per la realització de les extraccions i la cura dels pacients, a la Dra. Andrea Martín (membre de la UPIIP), la Dra. Susana Melendo i el Dr. Xavier Martínez-Gómez (del Servei d'Urgències Pediàtriques i del Servei de Medicina Preventiva i Epidemiologia del nostre centre, respectivament) per la seva col·laboració en la realització del treball, sense la qual hagués estat absolutament impossible tirar-lo endavant.

Al Dr. Ton Noguera (de la Unitat de Patologia Infecciosa, Servei de Pediatria de l'Hospital Sant Joan de Deú d'Esplugues) per la seva revisió crítica del manuscrit.

Als Dr. Encarnació Riudor i J. Antonio Arranz (del Laboratori de Metabolopaties del nostre centre) per la determinació de tots els estudis metabòlics realitzats als pacients, així com la seva interpretació.

A tota la gent de l'Hotel Riberias de Llavorsí, per la seva col·laboració durant l'estiu de 2009.

I finalment, i sobretot, a la Cristina i l'Adrià per ser-hi; a la meva família, els meus pares, Fermina i Pere, per ensenyar-me el camí, i la meva dona, Carme, i els meus fills Àngel, Pere i Adrià per il·luminar-lo cada dia.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Rates of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa, America, and Europe: Results from 13 perinatal studies. The Working Group on Mother-To-Child Transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;8:506-510.
2. Sturt AS, Dokubo EK, Sint TT. Antiretroviral therapy (ART) for treating HIV infection in ART-eligible pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;3:CD008440.
3. No authors listed. HIV-infected pregnant women and vertical transmission in Europe since 1986. European Collaborative Study. *AIDS* 2001;15:761-770.
4. Chouquet C, Burgard M, Richardson S et al: Timing of mother-to child HIV-1 transmission and diagnosis of infection based on Polymerase chain reaction in the neonatal period by a non-parametric method. *AIDS* 1997;11:1183-1184.
5. Dabis F, Newell ML, Fransen L, Saba J, Lepage P, Leroy V, et al. Prevention of mother-to-child transmission of HIV in developing countries: recommendations for practice. The Ghent International Working Group on Mother-To-Child Transmission of HIV. *Health Policy Plan* 2000;15:34-42.
6. Rojano X, Almeda J, Sánchez E, Fortuny C, Bertrán JM, Mur A, et al. Trends of HIV mother-to-child transmission in Catalonia, Spain, between 1987 and 2003. *Med Clin (Barc)* 2007;129:487-493.
7. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus

- type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1994;331:1173-80.
8. Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States. May 24, 2010; pp 1-117. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/PerinatalGL.pdf>. Accessed July 13 2010.
 9. Warszawski J, Tubiana R, Le Chenadec J, Blanche S, Teglas JP, Dollfus C, et al; ANRS French Perinatal Cohort. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. *AIDS* 2008;22:289-99.
 10. Tubiana R, Le Chenadec J, Rouzioux C, Mandelbrot L, Hamrene K, Dollfus C, et al. Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load <500 copies/ml at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). *Clin Infect Dis* 2010;50:585-96.
 11. Fernández-Ibieta M, Ramos Amador JT, Guillén Martín S, González-Tomé MI, Navarro Gómez M, Iglesias González-Nicolás E, et al. Why are HIV-infected infants still being born in Spain? *An Pediatr (Barc)* 2007;67:109-115.
 12. Townsend CL, Tookey PA, Cortina-Borja M, Peckham CS. Antiretroviral therapy and congenital abnormalities in infants born to HIV-1-infected women in the United Kingdom and Ireland, 1990 to 2003. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42:91-94.

13. Hanson IC, Antonelli TA, Sperling RS, Oleske JM, Cooper E, Culnane M, et al. Lack of tumors in infants with perinatal HIV-1 exposure and fetal/neonatal exposure to zidovudine. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999;20:463-467.
14. Benhammou V, Warszawski J, Bellec S, Doz F, André N, Lacour B, Levine M, et al; ANRS-Enquête Périnatale Française. Incidence of cancer in children perinatally exposed to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 2008;22:2165-77.
15. Joao EC, Calvet GA, Krauss MR, Freimanis Hance L, Ortiz J, Ivalo SA, et al; NISDI Perinatal Study Group. Maternal antiretroviral use during pregnancy and infant congenital anomalies: the NISDI perinatal study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;53:176-85.
16. Fernández Ibieta M, Ramos Amador JT, Bellón Cano JM, González-Tomé MI, Guillén Martín S, Navarro Gómez M, et al. Birth defects in a cohort of uninfected children born to HIV-infected women. *An Pediatr (Barc)* 2009;70:253-64
17. Poirier MC, Olivero OA, Walker DM, Walker VE. Perinatal genotoxicity and carcinogenicity of anti-retroviral nucleoside analog drugs. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:151-161.
18. Bunders MJ, Bekker V, Scherpbier HJ, Boer K, Godfried M, Kuijpers TW. Haematological parameters of HIV-1-uninfected infants born to HIV-1-infected mothers. *Acta Paediatr* 2005;94:1571-1577.

19. Mofenson LM, Munderi P. Safety of antiretroviral prophylaxis of perinatal transmission for HIV-infected pregnant women and their infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;30:200-15.
20. Fernández Ibieta M, Ramos Amador JT, González Tomé MI, Guillén Martín S, Bellón Cano JM, Navarro Gómez Met al. Anaemia and neutropenia in a cohort of non-infected children of HIV-positive mothers *An Pediatr (Barc)* 2008;69:533-43.
21. Paul ME, Chantry CJ, Read JS, Frederick MM, Lu M, Pitt J, et al. Morbidity and mortality during the first two years of life among uninfected children born to human immunodeficiency virus type 1-infected women: the women and infants transmission study. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:46-56.
22. Alimenti A, Forbes JC, Oberlander TF, Money DM, Grunau RE, Papsdorf MP, et al. A prospective controlled study of neurodevelopment in HIV-uninfected children exposed to combination antiretroviral drugs in pregnancy. *Pediatrics* 2006;118:e1139-45.
23. Newell ML, Borja MC, Peckham C; European Collaborative Study. Height, weight, and growth in children born to mothers with HIV-1 infection in Europe. *Pediatrics* 2003;111:e52-60.
24. Fernández M, Bellón JM, Ramos JT, González-Tomé MI, Guillén S, Navarro M et al. Exposición a antirretrovirales y crecimiento en una cohorte de niños no infectados, hijos de madre con VIH positivo. *An Pediatr (Barc)* 2009; 71:299-309.
25. Betteridge, DJ. What is oxidative stress?. *Metabolism* 2000; 49:3.

26. Wallace, DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?. *Science* 1992; 256:628.
27. Brinkman, K, ter Hofstede, HJ. Mitochondrial toxicity of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors: lactic acidosis, risk factors and therapeutic options. *AIDS Reviews* 1999; 1:141.
28. Lewis, W, Dalakas, MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med* 1995; 1:417.
29. Brinkman, K, ter Hofstede, HJ, Burger, DM, et al. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* 1998; 12:1735.
30. Kakuda, TN. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther* 2000; 22:685.
31. McKenzie, R, Fried, MW, Sallie, R, et al. Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1995; 333:1099.
32. Birkus, G, Hitchcock, MJ, Cihlar, T. Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:716.
33. Johnson, AA, Ray, AS, Hanes, J, et al. Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 2001; 276:40847.
34. Lim, SE, Copeland, WC. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase gamma. *J Biol Chem* 2001; 276:23616.

35. Frerichs, FC, Dingemans, KP, Brinkman, K. Cardiomyopathy with mitochondrial damage associated with nucleoside reverse-transcriptase inhibitors. *N Engl J Med* 2002; 347:1895.
36. Fortgang, IS, Belitsos, PC, Chaisson, RE, Moore, RD. Hepatomegaly and steatosis in HIV-infected patients receiving nucleoside analog antiretroviral therapy. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:1433.
37. Gérard, Y, Maulin, L, Yazdanpanah, Y, et al. Symptomatic hyperlactataemia: an emerging complication of antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14:2723.
38. Moyle, GJ, Datta, D, Mandalia, S, et al. Hyperlactataemia and lactic acidosis during antiretroviral therapy: relevance, reproducibility and possible risk factors. *AIDS* 2002; 16:1341.
39. Boubaker, K, Flepp, M, Sudre, P, et al. Hyperlactatemia and antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1931.
40. Vrouenraets, SM, Treskes, M, Regez, RM, et al. Hyperlactatemia in HIV-infected patients: the role of NRTI-treatment. *Antivir Ther* 2002; 7:21.
41. Freiman, J, Helfert, K, Hamrell, M, et al. Hepatomegaly with severe steatosis in HIV-seropositive patients. *AIDS* 1993; 7:379.
42. Blanche S, Tardieu M, Rustin P. et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 1999, 354: 1084 –1089.
43. Poulton J, Lyall H, Taylor G, Tudor Williams G. HIV-1 therapy and fetal mitochondrial dysfunction. *Lancet* 1999, 354:2081-2082.

44. Morris AM, Carr A. HIV nucleoside analogues: new adverse effects on mitochondria? *Lancet* 1999;354:1046-1047.
45. Stojanov S, Wintergerst U, Belohradsky B, Rolinski B. Mitochondrial and peroxisomal dysfunction following perinatal exposure to antiretroviral drugs. *AIDS* 2000;14:1669.
46. Gerschenson M, Nguyen V, Ewings EL, Ceresa A, Shaw JA, St Claire MC et al. Mitochondrial toxicity in fetal *Erythrocebus patas* monkeys exposed transplacentally to zidovudine plus lamivudine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:91-100.
47. Divi RL, Haverkos KJ, Humsi JA, Shockley ME, Thamire C, Nagashima K, et al. Morphological and molecular course of mitochondrial pathology in cultured human cells exposed long-term to Zidovudine. *Environ Mol Mutagen* 2007;48:179-89.
48. Meng Q, Olivero OA, Fasco MJ, Bellisario R, Kaminsky L, Pass KA et al. Plasma and cellular markers of 3'-azido-3'-dideoxythymidine (AZT) metabolism as indicators of DNA damage in cord blood mononuclear cells from infants receiving prepartum NRTIs. *Environ Mol Mutagen* 2007;48:307-21.
49. Olivero OA, Shearer GM, Chougnet CA, Kovacs AA, Baker R, Stek AM, et al. Incorporation of zidovudine into cord blood DNA of infants and peripheral blood DNA of their HIV-1-positive mothers. *Ann N Y Acad Sci* 2000;918:262- 8.
50. Brogly SB, Ylitalo N, Mofenson LM, Oleske J, Van Dyke R, Crain MJ, et al. In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children. *AIDS* 2007;21:929-38.

51. Divi RL, Walker VE, Wade NA, Nagashima K, Seilkop SK, Adams ME, et al. Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir. *AIDS* 2004;18:1013-21.
52. Bishop JB, Tani Y, Witt K, Johnson JA, Peddada S, Dunnick J, et al. Mitochondrial damage revealed by morphometric and semiquantitative analysis of mouse pup cardiomyocytes following in utero and postnatal exposure to zidovudine and lamivudine. *Toxicol Sci* 2004;81:512-7.
53. Shiramizu B, Shikuma KM, Kamemoto L, Gerschenson M, Erdem G, Pinti M, Cossarizza A, Shikuma C. Placenta and cord blood mitochondrial DNA toxicity in HIV-infected women receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors during pregnancy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;32:370-4.
54. Núñez MJ, Martín-Carbonero L, Moreno V, Valencia E, Garcia-Samaniego J, Castillo JG, et al. Impact of antiretroviral treatment-related toxicities on hospital admissions in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:825-9.
55. Blanco F, García-Benayas T, de la Cruz JJ, González-Lahoz J, Soriano V. First-Line Therapy and Mitochondrial Damage: Different Nucleosides, Different Findings. *HIV Clin Trials* 2003;4:11-19.
56. Montaner JS, Côté HC, Harris M, Hogg RS, Yip B, Harrigan PR, et al. Nucleoside-related mitochondrial toxicity among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: insights from the evaluation of venous lactic acid and peripheral blood mitochondrial DNA. *Clin Infect Dis* 2004;38:S73-9.

57. Noguera A, Fortuny C, Sanchez E, Artuch R, Vilaseca MA, Muñoz-Almagro C et al. Hyperlactatemia in human immunodeficiency virus-infected children receiving antiretroviral treatment. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:778-82.
58. Viganò A, Giacomet V. Nucleoside analogues toxicities related to mitochondrial dysfunction: focus on HIV-infected children. *Antivir Ther.* 2005;10:M53-64.
59. Koh MT. Unrecognized near-fatal hyperlactatemia in an HIV-infected infant exposed to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Int J Infect Dis* 2007;11:85-6.
60. Crain MJ, Chernoff MC, Oleske JM, Brogly SB, Malee KM, Borum PR, et al. Possible mitochondrial dysfunction and its association with antiretroviral therapy use in children perinatally infected with HIV. *J Infect Dis* 2010;202:291-301.
61. Rosso R, Nasi M, Di Biagio A, Repetto E, Dentone C, Pinti M, et al. Effects of the change from Stavudine to tenofovir in human immunodeficiency virus-infected children treated with highly active antiretroviral therapy: studies on mitochondrial toxicity and thymic function. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:17-21.
62. Williams PL, Marino M, Malee K, Brogly S, Hughes MD, Mofenson LM; PACTG 219C Team. Neurodevelopment and in utero antiretroviral exposure of HIV-exposed uninfected infants. *Pediatrics* 2010;125:e250-60.
63. Noguera A, Fortuny C, Muñoz-Almagro C, Sanchez E, Vilaseca MA, Artuch Ret al. Hyperlactatemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants who are exposed to antiretrovirals. *Pediatrics* 2004;114:e598-603.

64. No authors listed. From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA* 1993;269:729-30.
65. Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg* 1953; 32:260-7.
66. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, Ferrández Longás A, López-Siguero JP, Sánchez González E, et al; Grupo Colaborador Español. Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc)* 2008;68:552-69.
67. Alimenti A, Burdge DR, Ogilvie GS, Money DM, Forbes JC. Lactic acidemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants exposed to perinatal antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:782-9.
68. Ekouevi DK, Touré R, Becquet R, Viho I, Sakarovitch C, Rouet F, Agence Nationale de Recherches Sur le SIDA 1201/1202 Ditrane Plus Study Group. Serum lactate levels in infants exposed peripartum to antiretroviral agents to prevent mother-to-child transmission of HIV: Agence Nationale de Recherches Sur le SIDA et les Hépatites Virales 1209 study, Abidjan, Ivory Coast. *Pediatrics* 2006;118:e1071-7.
69. García-Algar O, Vall Combelles O, Puig Sola C, Mur Sierra A, Scaravelli G, Pacifici R, et al. Prenatal exposure to drugs of abuse using meconium analysis in a low socioeconomic population in Barcelona. *An Pediatr (Barc)* 2009;70:151-8.
70. Observatorio Español sobre Drogas (OED) Informe 2007 del observatorio español sobre drogas. Situación y tendencias de los problemas de droga en

- España. Observatorio Español sobre Drogas. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas. Madrid. 2007. Available at: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/publica/pdf/oed-2007.pdf> [Accessed: 26-08-2008]
71. Claret G, Noguera A, Esteva C, Muñoz-Almagro C, Sánchez E, Fortuny C. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection in Barcelona, Spain: a prospective study. *Eur J Pediatr* 2007;166:1297-9.
72. Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States. Dec17, 2004; pp 1-58. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/PerinatalGL12172004028.pdf>.
73. Hitti J, Frenkel LM, Stek AM, Nachman SA, Baker D, Gonzalez-Garcia A, et al. Maternal toxicity with continuous nevirapine in pregnancy – Results from the PACTG 1022. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;36:772–6.
74. European Collaborative Study, Swiss Mother and Child Cohort Study. Combination antiretroviral therapy and duration of pregnancy. *AIDS* 2000; 14:2913–2920.
75. Thorne C, Patel D, Newell ML, for the European Collaborative study. Increased risk of adverse pregnancy outcomes in HIV-infected women treated with highly active antiretroviral therapy in Europe. *AIDS* 2004; 18:2337–2339.
76. Kourtis AP. Antiretroviral drug use during pregnancy and risk of premature delivery: is there a connection? *J Infect Dis* 2010;201:978-80.

77. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG committee opinion scheduled Cesarean delivery and the prevention of vertical transmission of HIV infection. Number 234, May 2000 (replaces number 219, August 1999). *Int J Gynaecol Obstet* 2001;73:279-281.
78. European Mode of Delivery Collaboration. Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. The European Mode of Delivery Collaboration. *Lancet* 1999;353:1035-1039.
79. A Carrascosa Lezcano, A Ferrández Longás, D Yeste Fernández, J García-Dihinx Villanova, A Romo Montejo, et al. Estudio transversal español de crecimiento 2008. Parte I: valores de peso y longitud en recién nacidos de 26-42 semanas de edad gestacional. *An Pediatr (Barc)* 2008;68:544-51.
80. Nelhaus G. Head circumference from birth to eighteen years: practical composite international and interracial graphs. *Pediatrics* 1968; 41: 106-114.
81. Landreau-Mascaro A, Barret B, Mayaux MJ, Tardieu M, Blanche S; French Perinatal Cohort Study Group. Risk of early febrile seizure with perinatal exposure to nucleoside analogues. *Lancet* 2002;359:583-4.
82. Bruck I, Tahan TT, Cruz CR, Martins LT, Antoniuk SA, Rodrigues L et al. Developmental milestones of vertically HIV infected and seroreverters children: follow-up of 83 children. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59, 691-5.
83. Tardieu M, Brunelle F, Raybaud C, Ball W, Barret B, Pautard B, et al. Cerebral MR imaging in uninfected children born to HIV-seropositive mothers and perinatally exposed to zidovudine. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005;26:695-701.

84. Chase C, Ware J, Hittelman J, Blasini I, Smith R, Llorente A, et al. Early cognitive and motor development among infants born to women infected with human immunodeficiency virus. Women and Infants Transmission Study Group. *Pediatrics* 2000;106:e25.
85. Coplan J, Contello KA, Cunningham CK, Weiner LB, Dye TD, Roberge L, et al. Early language development in children exposed to or infected with human immunodeficiency virus. *Pediatrics* 1998;102:e8.
86. Montaner JS, Côté HC, Harris M, Hogg RS, Yip B, Chan JW, Harrigan PR, O'Shaughnessy MV. Mitochondrial toxicity in the era of HAART: evaluating venous lactate and peripheral blood mitochondrial DNA in HIV-infected patients taking antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;34:S85-90.
87. Montaner JS, Côté HC, Harris M, Hogg RS, Yip B, Harrigan PR, et al. Nucleoside-related mitochondrial toxicity among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: insights from the evaluation of venous lactic acid and peripheral blood mitochondrial DNA. *Clin Infect Dis* 2004;38:S73-9.
88. Garrabou G, Sanjurjo E, Miró O, Martínez E, Infante AB, López S, et al. Noninvasive diagnosis of mitochondrial dysfunction in HAART-related hyperlactatemia. *Clin Infect Dis* 2006;42:584-5.
89. Ruitenbeek W, Wendel U, Trijbels F, Sengers R. Mitochondrial energy metabolism. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, eds. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. London, United Kingdom: Chapman & Hall; 1996:390-406

90. de Mendoza C, Sanchez-Conde M, Ribera E, Domingo P, Soriano V. Could mitochondrial DNA quantitation be a surrogate marker for drug mitochondrial toxicity? *AIDS Rev* 2004;6:169-80
91. Aldrovandi GM, Chu C, Shearer WT, Li D, Walter J, Thompson B, et al. Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1-infected women. *Pediatrics* 2009;124:e1189-97.
92. Garrabou G, Morén C, Gallego-Escuredo JM, Milinkovic A, Villarroya F, Negro E, Giralt Met al. Genetic and functional mitochondrial assessment of HIV-infected patients developing HAART-related hyperlactatemia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;52:443-51.
93. McComsey GA, Kang M, Ross AC, Lebrecht D, Livingston E, Melvin A, et al; AIDS Clinical Trials Group A5084. Increased mtDNA levels without change in mitochondrial enzymes in peripheral blood mononuclear cells of infants born to HIV-infected mothers on antiretroviral therapy. *HIV Clin Trials* 2008;9:126-36.
94. Barret B, Tardieu M, Rustin P, Lacroix C, Chabrol B, Desguerre I, et al. Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants: clinical screening in a large prospective cohort. *AIDS* 2003;17:1769-85.
95. Benhammou V, Tardieu M, Warszawski J, Rustin P, Blanche S. Clinical mitochondrial dysfunction in uninfected children born to HIV-infected mothers following perinatal exposure to nucleoside analogues. *Environ Mol Mutagen* 2007;48:173-8.
96. Bulterys M, Nesheim S, Abrams EJ, Palumbo P, Farley J, Lampe M, Fowler MG; Perinatal Safety Review Working Group. Lack of evidence of mitochondrial

- dysfunction in the offspring of HIV-infected women. Retrospective review of perinatal exposure to antiretroviral drugs in the Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Nov;918:212-21.
97. Lindegren ML, Rhodes P, Gordon L, Fleming P; Perinatal Safety Review Working Group; State and Local Health Department HIV/AIDS Surveillance Programs. Drug safety during pregnancy and in infants. Lack of mortality related to mitochondrial dysfunction among perinatally HIV-exposed children in pediatric HIV surveillance. *Ann N Y Acad Sci* 2000;918:222-35
98. No authors listed. Nucleoside exposure in the children of HIV-infected women receiving antiretroviral drugs: absence of clear evidence for mitochondrial disease in children who died before 5 years of age in five United States cohorts. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;25:261-8.
99. Dominguez K, Bertolli J, Fowler M, Peters V, Ortiz I, Melville S, Rakusan T, Frederick T, Hsu H, D'Almada P, Maldonado Y, Wilfert C; PSD Consortium. Perinatal Safety Review Working Group. Lack of definitive severe mitochondrial signs and symptoms among deceased HIV-uninfected and HIV-indeterminate children < or = 5 years of age, Pediatric Spectrum of HIV Disease project (PSD), USA. *Ann N Y Acad Sci* 2000;918:236-46.
100. Culnane M, Fowler M, Lee SS, McSherry G, Brady M, O'Donnell K, et al. Lack of long-term effects of in utero exposure to zidovudine among uninfected children born to HIV-infected women. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 219/076 Teams. *JAMA* 1999;281:151-7.

101. Giaquinto C, De Romeo A, Giacomet V, Rampon O, Ruga E, Burlina A, et al. Lactic acid levels in children perinatally treated with antiretroviral agents to prevent HIV transmission. *AIDS* 2001;15:1074-5.
102. Chotpitayasunondh T, Vanprapar N, Simonds RJ, Chokephaibulkit K, Waranawat N, Mock P, et al. Safety of late in utero exposure to zidovudine in infants born to human immunodeficiency virus-infected mothers: Bangkok. Bangkok Collaborative Perinatal HIV Transmission Study Group. *Pediatrics* 2001;107:E5.
103. Tovo PA, Chiapello N, Gabiano C, Zeviani M, Spada M. Zidovudine administration during pregnancy and mitochondrial disease in the offspring. *Antivir Ther* 2005;10:697-9.
104. Cherry CL, Lala L, Wesselingh SL. Mitochondrial toxicity of nucleoside analogues: mechanism, monitoring and management. *Sex Health* 2005;2:1-11.
105. Divi RL, Leonard SL, Kuo MM, Nagashima K, Thamire C, St Claire MC, et al. Transplacentally exposed human and monkey newborn infants show similar evidence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Environ Mol Mutagen* 2007;48:201-9.
106. Walker UA, Setzer B, Volksbeck SI. Toxicity of nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors. *Lancet* 2000;355:1096.
107. Moyle G. Mitochondrial toxicity: myths and facts. *J HIV Ther* 2004;9:45-7.
108. Poirier MC, Divi RL, Al-Harhi L, Olivero OA, Nguyen V, Walker B, Landay AL et al. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:175-83.

109. European Collaborative Study. Exposure to antiretroviral therapy in utero or early life: the health of uninfected children born to HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;32:380-7.
110. Funk MJ, Belinson SE, Pimenta JM, Morsheimer M, Gibbons DC. Mitochondrial disorders among infants exposed to HIV and antiretroviral therapy. *Drug Saf* 2007;30:845-59.
111. Tozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res* 2010;85:190-200.
112. Sánchez Hellín V, Gutiérrez Rodero F. Toxicogenetics of antiretroviral treatment (II): neurotoxicity, hepatotoxicity, lactic acidosis, kidney damage, and other adverse effects of antiretroviral drugs. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26: S24-S33.

10. ANNEX

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA
Hiperlactacidemia en hijos de madre VIH no infectados y expuestos a
antiretrovirales (2004-2007)

DON/DOÑA: **con**
DNI:.....
(Nombre y dos apellidos)

EN CALIDAD DE (REPRESENTANTE LEGAL
FAMILIAR O ALLEGADO) DE:
.....
(Nombre y apellidos del paciente)

DECLARO:

QUE EL DOCTOR/A:
(Nombre y dos apellidos del facultativo que proporciona la información), me ha informado sobre la naturaleza del estudio en el que me propone que mi hijo participe.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento puedo abandonar el estudio revocando el consentimiento que ahora presto.

Finalmente se asegura la privacidad de los resultados y su uso exclusivo para fines médicos.

Y en tales condiciones:
CONSIENTO LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Barcelona a de de

Fdo. EL MÉDICO Fdo. EL REPRESENTANTE LEGAL Fdo: TESTIGO