

112 62  
18  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.  
FACULTAD DE MEDICINA.  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

## TESIS.

**Expresión de óxido nítrico sintasa inducible  
(iNOS) y apoptosis en células de lavado  
broncoalveolar en niños con infección perinatal  
por el VIH-1 y tuberculosis pulmonar**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

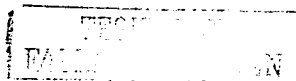
MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA LA ALUMNA:

MARIA DEL CARMEN GORBEA ROBLES.

TUTORES.

DR. CESAR R GONZALEZ BONILLA  
DRA. CARMEN SOLER CLAUDIN





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

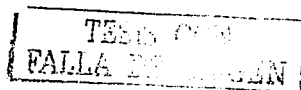
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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


**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

**Tabla de contenidos:**

1. Antecedentes Científicos
2. Preguntas de Investigación
3. Objetivos
4. Hipótesis
5. Diseño de estudio
6. Material y Métodos
7. Análisis Estadístico
8. Resultados
9. Discusión
10. Conclusiones
11. Tablas y figuras
12. Bibliografía



Autorizado por la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM y dirigido en formato electrónico a través del  
centro de trabajo editorial.

NOMBRE MA. DEL CARMEN  
GORREO ROBLES  
FECHA 26-NOVIEMBRE-2003  
FIRMA P.R. 

### Presentación:

Existe una pequeña diferencia entre la persona común y aquellas personas que han logrado aprovechar al máximo su potencial y han sobresalido a aquello a lo que se dedican.

Lo que los hace diferentes no es una inteligencia superior ni una mejor aptitud física, ni una mejor educación, ni con mucho tener mucha suerte.

Sobran ejemplos de grandes personajes que se han sobrepuesto a situaciones terribles de su vida, y pese a ello han logrado ser ejemplos a seguir.

Cuál es su secreto?

Si todos compartimos más ó menos las mismas características y hemos sido dotados con los mismos dones, porqué entonces unos logran siempre lo que se proponen y otros se conforman con quejarse, resignarse ó simplemente sobrevivir?

El secreto está en la actitud que tienen ante las situaciones que la vida les presenta.

Esa es la diferencia.

Trabaja en  
FALLA DE CALIDAD

1-B

**Agradecimientos:**

A mi querida familia (padres, esposo, hijas) quienes compartieron conmigo momentos difíciles.  
Quienes además me infundieron ánimo diciéndome:

"El miedo al fracaso no debe ser nunca una razón para no intentar algo"

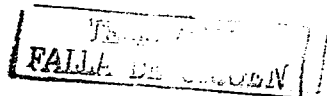
A la M en C. Carmen Soler Claudín

Quién alguna vez me dijo algo así como.....

"La mayoría de la gente tiene miedo a perder, y este miedo es más grande que su deseo de ganar. La mayoría trabaja más duro en aferrarse a lo que tiene, que en tomar riesgos necesarios para alcanzar sus sueños".....  
Muchas gracias Carmen

Dr César Raúl González Bonilla

Su comentario: "La mejor forma de tratar con una mente cerrada es mantener la boca cerrada" me fue muy útil en este periodo  
.....gracias

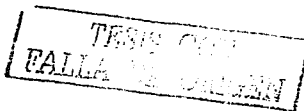


1-C

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS y la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, así como del Servicio de Endoscopías Pediátricas del HG del CMNR, IMSS. Se obtuvo financiamiento a través del Fondo de Fomento a la Investigación (FOFOI) FP 0038/1274 IMSS (I.P. CRGB). Se apegó totalmente a la declaración de Helsinki con la modificación de Sudáfrica de 1996 y con los requerimientos del Código Sanitario Mexicano para la realización de estudios en humanos de 1998. Fue revisado y aprobado por los comités local y nacional de Investigación del IMSS (registro local 2000-693 002).

**Agradecimientos:**

Se agradece la participación de la Dra. Sara Huerta Yépez, Dra. Guadalupe García E, miembros de la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional "La Raza", M en C José Carmen Gudiño, M en C. María del Carmen Basuaído, miembros de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos de la DGE de la SS y de la Dra. Rosalía Austria M., jefa del servicio de Endoscopías Pediátricas del HG del CMN La Raza. Por su inapreciable ayuda logística y técnica y por su paciencia para la realización del presente estudio.



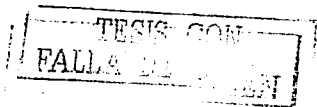
## RESUMEN.

**OBJETIVO.** Los macrófagos residentes en el pulmón juegan un papel fundamental en el control de infecciones por microorganismos intracelulares, uno de los principales mecanismos mediante los cuales controlan estas infecciones es que al activarse producen óxido nítrico (NO), el cual posee una potente actividad microbicida. Sin embargo cuando disminuye la población de celular local o se encuentra funcionalmente alterada, se facilita la diseminación de los microorganismos. Considerando que la coinfección por VIH-1 y *Mycobacterium tuberculosis* es frecuente y que ambos patógenos alteran la respuesta inmunológica, se decidió estudiar la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la tendencia a desarrollar apoptosis después de activación, en células de lavados broncoalveolares (LBA) de niños con SIDA perinatal y tuberculosis, comparados con niños solo con tuberculosis y con niños sanos.

**MATERIAL Y METODOS.** Se obtuvieron células de LBA de 18 niños divididos en 4 grupos: a) SIDA b) SIDA más tuberculosis, c) tuberculosis, y d) niños sanos. La presencia del VIH-1 en el sobrenadante y células de LBA fue demostrada mediante la amplificación del gen *gag* por RT-PCR y PCR anidada. La expresión de iNOS se determinó mediante RT-PCR a partir de células de LBA no activadas y de células de LBA activadas con phorbol miristato acetato (PMA). El índice de apoptosis en células de LBA activadas y no activadas fue medido mediante la técnica de TUNEL.

**RESULTADOS:** En el sobrenadante de LBA de todos los niños con SIDA se amplificó DNA proviral y RNA del gen *gag* y en células de LBA en un niño que tenía SIDA y tuberculosis. En ningún caso se demostró con capacidad infectante viral mediante cocultivo *in vitro*. Aunque en todos los grupos se demostró la expresión de iNOS ésta parece estar disminuida en los pacientes con coinfección por VIH-1 y *M. tuberculosis*. La proporción de células apoptóticas fue mayor posterior a la estimulación con PMA en el grupo de niños con SIDA más tuberculosis en comparación con los otros grupos de pacientes.

**CONCLUSIONES:** Se demostró que las células de LBA en los niños son probables reservorios del VIH-1 pues se amplificó DNA proviral, pero se demostró la existencia de partículas virales infectantes. Así mismo, en los niños con coinfección por SIDA + tuberculosis, las células de LBA desarrollaron mayor proporción de apoptosis y menor transcripción de iNOS ante el estímulo con PMA. Estos datos sugieren una afectación de los mecanismos de activación de las células pulmonares en los pacientes pediátricos con coinfección por VIH-1 y *M. tuberculosis*.





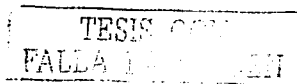
## SUMMARY:

**PURPOSE.** Alveolar macrophages residing in lung play a fundamental role in the control of intracellular infections. A main control mechanism resides in their ability to produce the highly microbicidal molecule nitric oxide (NO) when they are activated. However when the local cell population decreases or has functional alterations, the dissemination of intracellular pathogens may be facilitated. Coinfection with HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* is a frequent event which leads to profound immunological alterations. Therefore, we decided to investigate the inducible nitric oxide synthase (iNOS) production and the tendency to develop apoptosis upon activation in cells of bronchoalveolar lavages (BAL) obtained from pediatric patients with perinatal AIDS and tuberculosis as compared with children with AIDS or tuberculosis.

**MATERIAL AND METHODS.** BAL cells from 18 children, were classified in four groups were obtained: a) AIDS b) AIDS and tuberculosis, c) tuberculosis, and d) healthy children. HIV was demonstrated amplifying the *gag* gene in supernatant and cells from BAL by nested PCR and RT-PCR. iNOS expression was assessed by RT-PCR in BAL cells activated with phorbol myristate acetate (PMA). The apoptotic index was determined by TUNEL in cells from BAL activated with PMA.

**RESULTS.** HIV-1 proviral DNA and RNA was amplified from BAL supernatant from all patients with AIDS and in cells from one patient with HIV-1 and *M. tuberculosis* coinfection. In no case it was possible to identify infecting virus by *in vitro* co-culture. Although iNOS expression was demonstrated in all groups, it seems to be decreased in patients with coinfection with VIH-1 and *M. tuberculosis*. Higher proportion of apoptotic cells upon stimulation with PMA was observed in patients with AIDS and tuberculosis as compared with the other patients.

**CONCLUSIONS.** It was demonstrated that cells from BAL may function as reservoir of HIV-1 because proviral DNA was amplified in this compartment. Nevertheless, infecting viral particles were not demonstrated. After stimulation with PMA, BAL cells from children with AIDS and tuberculosis developed apoptosis in a higher proportion and presented less iNOS transcription than the other groups. These data suggest that the activation mechanisms of pulmonary cells are affected in children coinfecting with HIV-1 and *M. tuberculosis*



## ANTECEDENTES

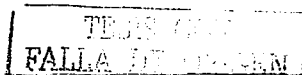
La epidemia mundial del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) tiene cada vez mayor impacto sobre la salud materno-infantil. En 1994, se estimaba que existían alrededor de 3 millones de niños infectados en el mundo; cifra que puede incrementarse rápidamente de no existir medidas preventivas efectivas, pues se calcula que en el año 2000 hubo 40 millones de personas infectadas y, conforme la razón hombre: mujer se acerque más a 1:1, la proporción de niños con SIDA crecerá cada vez más, debido a mayor riesgo de transmisión vertical.

Las tasas de transmisión pennatal varían del 5 al 40% siendo las más bajas en Europa y Estados Unidos y las más altas en África <sup>1</sup>. Se calcula que mientras que en los países avanzados nace un niño al año infectado por el VIH, en los países en vías de desarrollo nacen aproximadamente 100 al día <sup>2</sup>. En México la estrategia de administrar tratamiento antirretroviral a las embarazadas con VIH-1 ha logrado disminuir el riesgo de transmisión vertical. Los esquemas altamente efectivos de tratamiento antirretroviral han revolucionado el tratamiento del SIDA en los niños, ofreciendo períodos prolongados de supresión viral y por lo tanto restauración de la respuesta inmune. Así mismo, el tratamiento profiláctico contra las principales infecciones por agentes oportunistas en los niños con infección avanzada ha ayudado a reducir la morbilidad y mortalidad asociada al SIDA y, por ende, ha aumentado su calidad de vida <sup>3</sup>.

El VIH, que pertenece a la familia de los lentivirus, es el agente etiológico del SIDA <sup>3</sup>. Existen dos tipos de VIH: el VIH-1, se encuentra diseminado en todo el mundo y es responsable de la mayoría de casos de SIDA; y el VIH-2, que se encuentra relativamente restringido al África. Muy probablemente el VIH-1 proviene de infección viral (SIV<sub>CPZ</sub>) transmitida a partir de chimpancés, en tanto que el VIH-2 parece provenir de otros primates <sup>4,5</sup>. La mayoría de los casos de la pandemia de SIDA en el mundo se deben a VIH-1 del grupo M, el cual a su vez se divide en subgrupos o subtipos ("clades"), que tienen una alta homología.

El proceso de evolución del VIH incluye tanto mutaciones como recombinaciones, lo que aumenta considerablemente su capacidad de variación <sup>6,7</sup>. La importancia epidemiológica reside en el hecho de que los diferentes subgrupos tienen una distribución geográfica bien definida, pero dinámica y su estudio puede proporcionar información sobre el comportamiento de los patrones de diseminación de la pandemia; por otro lado, los ensayos diagnósticos genéticos, generalmente basados en el subgrupo B, pueden dar resultados inexactos en los lugares donde hay otros subgrupos prevalentes <sup>8</sup>. La información sobre la virulencia de los subtipos es contradictoria, algunos reportes sugieren que existen subtipos que se asocian a una progresión más rápida de la enfermedad <sup>9</sup>, en tanto que otros no encuentran ninguna correlación <sup>10</sup>.

El virión de VIH consiste en dos copias de RNA de una sola cadena, las cuales están empaquetadas dentro de un core, que contiene varias proteínas esenciales para el ciclo de replicación viral, como son la transcripción reversa y la integración. El core a su vez está envuelto por una membrana lipídica, que proveniente de la célula infectada, donde se encuentran embebidas las glicoproteínas virales gp120 y gp41 fuertemente



asociadas formado heterotrímeros. La glicoproteína gp120 tiene gran afinidad por la molécula CD4 (presente en linfocitos T cooperadores, en monocitos y en macrófagos) y por tanto media la adhesión del virus a las células que infecta. Sin embargo, para que el virus penetre a sus células blanco, es necesaria la participación de un segundo receptor que se une a un dominio diferente de gp120 y que provoca cambios conformacionales en el complejo gp120-gp41 y que exponen un dominio hidrofóbico de la glicoproteína gp41, responsable de iniciar el proceso de fusión viral a la célula blanco. Los dos correceptores bien caracterizados para el VIH-1 pertenecen a la familia de los receptores para quimiocinas<sup>11</sup>. El receptor CCR5, normalmente ligando de las  $\beta$ -quimiocinas RANTES (CCL5), MIP-1 $\alpha$  (CCL3) y MIP-1 $\beta$ (CCL4), participa en la fusión de VIH-1 monocitotrópico no formador de sincicios (NSI o R5) a monocitos y linfocitos<sup>12,13</sup>. El receptor CXCR4, también conocido como fusina y normalmente ligando de la quimiocina SDF-1, participa en la infección de capas linfocitotrópicas de VIH formadoras de sincicios (SI o X4) a linfocitos T<sup>14</sup>. Además, se ha demostrado que otros receptores para quimiocinas, como CCR2 y CCR3, pueden también servir como correceptores del VIH-1 en determinadas condiciones experimentales *in vivo*, pero probablemente no tienen esta propiedad durante el proceso de infección *in vivo*.<sup>15,16</sup> Así mismo, se ha sugerido que hay otros receptores que median la infección de otras células de la médula ósea<sup>17</sup>. Recientemente se ha comprobado que cepas X4 o SI de VIH-1 infectan *in vitro* a linfocitos T CD8<sup>+</sup> de manera independiente de CD4, CXCR4 o CCR5, pues el virus muta generando cepas CD8-trópicas que pueden utilizar a CD8 como único receptor.<sup>18,19</sup> En pacientes con SIDA se han aislado clones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productoras de virus viable<sup>20</sup>. Estos hallazgos pudiesen tener implicaciones importantes en el entendimiento de la fisiopatología de la infección por VIH-1, pues se sabe que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tienen un papel protector fundamental y que el desarrollo del SIDA se asocia su declinación.

### **Fisiopatología del SIDA.**

El VIH-1 se transmite por vía sexual, parenteral, por productos derivados de la sangre, rara vez por exposición de mucosas con sangre contaminada, durante el embarazo y en el periodo neonatal. El trauma rectal y la presencia de lesiones ulcerativas en el tracto genital incrementan el riesgo de infección por el VIH-1 durante el contacto sexual. Durante el coito el virus se deposita en las mucosas de los órganos genitales, orofaringe o recto, los cuales contienen gran cantidad de células dendríticas (DC) y células de Langerhans, que atrapan partículas virales<sup>21,22</sup>. Estas células capturan al VIH-1 mediante la lectina de superficie DC-SIGN (CD209), que es un receptor para gp120. Si el virus no es internalizado, puede permanecer viable en la superficie celular varios días y ser transportado rápidamente hasta ganglios linfáticos regionales donde encuentra linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>23</sup>. El virus puede infectar también linfocitos T CD4<sup>+</sup> y macrófagos residentes en el tejido linfoide asociado a las mucosas<sup>24</sup>. Una vez que gana acceso a los ganglios linfáticos regionales, se presenta una primera viremia que lleva a una amplia diseminación del virus en todos los tejidos linfoides del organismo, donde puede permanecer "latente". Las células dendríticas foliculares (FDC) y también los linfocitos B pueden funcionar como reservorios extracelulares del VIH-1, pues se ha demostrado que los viriones opsonizados por complemento se adhieren al receptor de



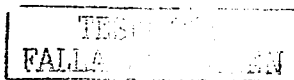
complemento CR2 (CD21), permaneciendo viables en la superficie de los linfocitos B<sup>25</sup>. Además, el virus puede encontrar otras vías de diseminación, incluso en células CD4<sup>+</sup>, pues se ha demostrado *in vitro* que células cocultivadas con linfocitos CD4<sup>+</sup> infectados, que sufren apoptosis, pueden tomar cuerpos apoptóticos conteniendo DNA proviral e infectarse de manera independiente de CD4 y los receptores de quimiocinas<sup>26</sup>. También se ha demostrado que el VIH-1 tiene capacidad de unirse a la "Lectina Adherente a Manosa" ("Mannose-Binding Lectin" o MBL), que es una proteína sérica que interviene en la adhesión de microorganismos a diversos elementos de la inmunidad innata<sup>27</sup>.

El VIH-1 infecta principalmente a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y las células monocíticas; sin embargo, virtualmente cualquier célula que exprese CD4 y un coreceptor apropiado puede ser anfitrión del VIH-1. Así mismo, *in vitro* se ha logrado infección en diferentes líneas celulares entre las que se incluyen FDC, células de la microglía, megacariocitos y eosinófilos, células del timo, del estroma de la médula ósea, astrocitos, oligodendrocitos, células del epitelio renal, del cérvix, células trofoblásticas, de la mucosa rectal e intestinal. Existen por lo menos tres mecanismos dominantes que conducen a la pérdida progresiva de células CD4 en la infección por el VIH-1. Primero, el VIH-1, sobre todo las cepas SI o X4, causa muerte celular por su efecto citopático directo; segundo, existe un incremento en la inducción de apoptosis, tanto de las células infectadas como en las células vecinas CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Son varios los mecanismos, pues las proteínas virales Tat y gp120 solubles inducen la expresión de FasL (CD178)<sup>28</sup>, en tanto que gp120 y SDF1 (CXCL12) incrementan la expresión membranar de TNF $\alpha$  y de TNFRII<sup>29</sup>; también puede haber un proceso de muerte inducida por activación ("activation induced cell death" o AICD) mediado por Fas/FasL (CD95/CD178)<sup>30</sup>, por TNF<sup>31,32</sup> o por mecanismos independientes de Fas (CD95)<sup>32-34</sup>. Por último, las células CD4 infectadas pueden ser destruidas por los linfocitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos que los reconocen por los péptidos virales presentados por MHC clase I.

### Manifestaciones clínicas.

La infección por VIH-1 sigue un curso clínico típico en la mayoría de los pacientes, los cuales desarrollan inmunodeficiencia severa en ausencia de tratamiento en un periodo aproximado de diez años<sup>35</sup>. Se ha observado que existe una pequeña proporción de pacientes (aproximadamente el 5%) en los que la infección por VIH-1 progresa lentamente y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> permanecen prácticamente normales con niveles muy bajos de RNA viral circulante. Este estado, llamado de "lento-progresor" o "no-progresor", se explica porque algunas personas pueden infectarse con virus parcialmente atenuados de manera natural<sup>36</sup> debido a que desarrollan mutaciones que disminuyen su capacidad replicativa<sup>37</sup> o, bien porque algunos individuos tienen una resistencia innata parcial a la infección por el VIH<sup>38</sup>.

La infección por el VIH-1 se caracteriza por la depleción progresiva de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que condiciona un estado de inmunosupresión severa con síntomas constitucionales, alteraciones neurológicas, infecciones por agentes oportunistas y neoplasias<sup>35</sup>. En la infección por el VIH-1 los mecanismos intrínsecos de defensa del hospedero no son capaces de eliminar al virus<sup>39,40</sup>.



En los niños infectados verticalmente hay un período de latencia más corto que en los adultos y más viremia cuando se compara con aquellos niños que se infectaron al recibir transfusiones. La mayoría de los niños infectados desarrollan enfermedad clínica en el primer año de vida<sup>41</sup>. Algunos pacientes presentan formas clínicas rápidamente progresivas de SIDA que se caracterizan por infecciones por gérmenes oportunistas, infecciones bacterianas severas recurrentes, cáncer, encefalopatía y síndrome de desgaste; en cambio, otros permanecen asintomáticos durante varios años. Aunque no se conocen con exactitud que factores determinan el curso clínico de la enfermedad, se sabe que los productos placentarios son especialmente vulnerables a la exposición intrauterina<sup>42</sup> y que los infantes infectados durante la gestación tienen infección más extensa y por tanto enfermedad más acelerada, que aquellos que se infectan durante el parto. De cualquier manera, la carga viral materna y la cuenta de CD4 tienen valor pronóstico<sup>43</sup> y es posible predecir SIDA estableciendo un punto de corte de linfocitos CD4<sup>+</sup> de 1500 células/ $\mu$ l a los 3 o 6 meses de edad<sup>44,45</sup>.

El espectro clínico de SIDA en infantes difiere en los países desarrollados y en los países en vías de desarrollo. En países en vías de desarrollo, la mayoría de los infantes con infección sintomática por VIH-1, manifiestan durante el primer año de vida retraso en el crecimiento y desarrollo, neumonía, diarrea, candidiasis oral, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia<sup>45-46</sup>. En Latinoamérica los datos de autopsia revelan que las infecciones por gérmenes oportunistas más frecuentes incluyen *Candida sp.*, *Pneumocystis carinii*<sup>47</sup> se asocia con desnutrición, trastornos del crecimiento y tuberculosis<sup>48</sup>. Los síndromes clínicos de SIDA en niños de África son difíciles de reconocer sin la ayuda de la serología, la desnutrición y las infecciones respiratorias son dominantes y los pacientes tienen muy mal pronóstico<sup>49</sup>.

En los niños el virus afecta con frecuencia al Sistema Nervioso Central. La exposición intrauterina al VIH sin infección parece no tener efectos negativos sobre las funciones neurológicas<sup>50</sup>. Pero una vez que se establece infección, los desórdenes neurológicos son complejos y puede haber grado variable de retraso mental, de afectación de la motricidad o del comportamiento<sup>51</sup>. El complejo de demencia en el SIDA es un síndrome caracterizado por defectos cognitivos y disfunción conductual y motora. El lenguaje expresivo se afecta más tempranamente que el lenguaje receptivo y la función cognitiva se mantiene estable<sup>51</sup>. Aunque algunos autores afirman que en la microcefalia que se observa en la infección por VIH congénita, la pérdida de tejido cerebral es global y proporcional entre corteza, materia gris subcortical y materia blanca<sup>52</sup>, pero otros han encontrado un patrón específico de atrofia distinto a otras etiologías, caracterizado por atrofia central, que primariamente afecta la materia blanca subcortical o las regiones de los ganglios basales<sup>53</sup>. Sin embargo, la experiencia de la clínica de SIDA en niños del Hospital de Infectología del CMN "La Raza", que atiende actualmente a 97 niños de una cohorte acumulada de 320 pacientes es diferente, pues solo se ha observado daño neurológico asociado a SIDA en 4 pacientes (1.25%), así mismo la neumonía por *P. carinii* solo se ha comprobado en 10 casos (3.12%) y, a diferencia de lo reportado en la literatura, se ha observado mayor incidencia de tuberculosis en los niños con SIDA en comparación con la experiencia de otros centros<sup>54</sup>.



El VIH-1 no parece infectar activamente a las neuronas, sino más bien induce apoptosis, mediante factores neurotóxicos como citocinas, mediadores fosfolípidos, eicosanoides y productos derivados de macrófagos infectados en el cerebro <sup>55</sup>. La glicoproteína de la envoltura gp120 también ha sido implicada en los mecanismos patogénicos, pues se ha demostrado que induce la producción de niveles tóxicos de óxido nítrico (NO), causando retardo en el aprendizaje y en el desarrollo de conductas motoras complejas en ratos neonatos <sup>56</sup>. De cualquier modo, el progreso de la infección neurológica por VIH parece estar asociada con el incremento en la replicación viral y la resistencia a la zidovudina (AZT) <sup>57</sup>. El tratamiento antiviral específico tiene efectos muy limitados en las manifestaciones neurológicas de los niños sintomáticos <sup>58</sup>.

La infección perinatal por VIH también causa nefropatía, probablemente mediante un efecto directo del virus sobre las células renales, y que se caracteriza por glomeruloesclerosis segmentaria focal, aunque se pueden observar otras lesiones. Tal como sucede en los adultos, una vez que se establece el daño renal, la sobrevida de los pacientes se disminuye notablemente <sup>59</sup>. Los infantes afectados por el VIH son especialmente susceptibles a la coinfección por CMV <sup>60</sup>, la cual acelera el curso clínico y la a severidad del SIDA. La presencia de DNA de CMV en plasma de estos pacientes es un factor de mal pronóstico <sup>61</sup>.

Los niños afectados por VIH pueden presentar también tumores, como Linfomas no-Hodgkin y Sarcoma de Kaposi <sup>61</sup>, o un cuadro clínico que progresa rápidamente y que se asemeja al síndrome de DiGeorge debido a bajas poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> <sup>62</sup>. La infección más frecuente es la neumonía por *P. carinii*, el tracto respiratorio y digestivo pueden tener ulceraciones, leucoplaquia, edema de mucosa esofágica en los pacientes que tiene infección por *Candida* <sup>63</sup>. Algunos niños afectados también pueden desarrollar enfermedades reumatológicas <sup>64</sup> y debido al desbalance que existe en la respuesta Th1-Th2 se considera que también puede haber asociación con enfermedades alérgicas y autoinmunes <sup>65</sup>.

#### **VIH y tuberculosis.**

Debido a la epidemia de SIDA hay una reemergencia mundial de la tuberculosis, que afecta sobre todo a los países subdesarrollados <sup>66</sup>. Los niños con infección por VIH tienen manifestaciones atípicas de tuberculosis <sup>67</sup> y el estado nutricional es determinante en el curso que sigue la enfermedad <sup>68</sup>. Los pacientes con VIH o SIDA parecen ser menos infecciosos a sus contactos que los pacientes VIH negativos <sup>69</sup>.

La tuberculosis causa la muerte de más adultos que todas las demás causas de infección juntas. Hay mucho más niños huérfanos debido a la tuberculosis que a cualquiera otra de las enfermedades infecciosas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en la década recién concluida ya se han presentado 95 millones de nuevos casos de tuberculosis de los cuales 17 millones correspondían a niños menores de 15 años. Uno de los puntos más inquietantes de todas las estadísticas es que 50 millones de nuevos casos por lo menos, son la consecuencia de una infección por bacilos resistentes a por lo menos un medicamento antituberculoso. El peligro parece

PROCESADO  
FALLA

más amenazante en países en vías de desarrollo por las condiciones socioeconómicas de éstos. No obstante, el crecimiento de las interconexiones en el mundo hace que esta situación actualmente sea un problema mundial <sup>69</sup>.

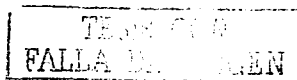
En esta década han sido gastados en el mundo aproximadamente 3,300 dólares americanos por cada caso de muerte por SIDA. Para la tuberculosis el gasto calculado sobre bases similares no ha sido más que de 13 dólares americanos. En 1990 un tercio de la población mundial había presentado algún tipo de infección por micobacterias, causando 8 millones de nuevos casos por esta situación tan solo en ese año <sup>70</sup>.

En el transcurso de la última década se ha percibido a nivel mundial un aumento en la incidencia de tuberculosis. La OMS estima que el número de nuevos casos de tuberculosis va a pasar de 8.8 millones en 1995 a 10.2 millones para el año que recién ha concluido y a 11.9 millones en el 2005 <sup>70</sup>. La OMS ha estimado, por otra parte, que 5.6 millones de personas estaban infectadas a la vez por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) y el bacilo tuberculoso en 1994. La mayor parte de ellas procedentes del África subsahariana. En 1990, un 4.2% de todos los casos de tuberculosis en el mundo también podrían ser atribuidos al VIH-1, proporción que, según la OMS, fue de aproximadamente 13.8% para el año 2000 <sup>70</sup>.

La incidencia es más elevada en los indigentes y en los drogadictos, y la tercera parte de estos individuos están también infectados por el VIH-1. De las personas con infección por el VIH-1 existe un incremento en la reactivación primaria de la tuberculosis para un segundo episodio tuberculoso por reinfección exógena. La susceptibilidad a la tuberculosis está en relación con el patrón de citocinas producidas por los linfocitos T. Los linfocitos Th1 que producen IFN $\gamma$ , son la una pieza fundamental de defensa contra la infección por *Mycobacterium*. La infección tuberculosa fatal es la que se presenta en los niños con ausencia del receptor para el IFN $\gamma$ . En contraste, los linfocitos Th2, los cuales producen IL-4 e IL-10 no contribuyen a la inmunidad antimicobacteriana <sup>71</sup>. Cuando los linfocitos de sangre periférica provenientes de pacientes con infección por el VIH-1 y tuberculosis son expuestos a *M. tuberculosis in vitro*, producen menos IFN $\gamma$  pero cantidades similares de IL-4 e IL-10, comparados con los linfocitos provenientes de pacientes negativos para la infección por el VIH-1 con tuberculosis. Estos hallazgos sugieren que existe una respuesta Th1 reducida en los pacientes infectados con el VIH-1 que contribuye a la susceptibilidad a la tuberculosis <sup>72</sup>.

La exposición de los macrófagos alveolares y los linfocitos de los pacientes con infección por el VIH-1 a *M. tuberculosis in vitro* sobregula la replicación viral. El líquido pleural proveniente de pacientes con tuberculosis incrementa la replicación del VIH-1 en linfocitos activados y en los pacientes con infección por el VIH-1 más tuberculosis pulmonar las concentraciones de RNA retroviral en el LBA es muy elevado en estos individuos <sup>73</sup>.

*M. tuberculosis* probablemente incrementa la replicación del VIH-1 por la inducción en los macrófagos del factor del TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 <sup>74</sup>. Ensayos clínicos han demostrado un



efecto deletéreo de la tuberculosis en el curso de la infección por el VIH-1. El riesgo de muerte en pacientes con infección por el VIH-1 y tuberculosis se ha reportado al doble en comparación con los individuos que solo tienen la infección por el VIH-1, independientemente de la cuenta de células CD4<sup>+</sup> <sup>75</sup>. El grado de inmunosupresión es el factor predictivo más importante para la sobrevida de los individuos infectados por el VIH-1 y la tuberculosis, el PPD negativo, el antecedente de infecciones por agentes oportunistas y la cuenta de células CD4<sup>+</sup> baja se encuentran asociadas a una elevada mortalidad.

Se sabe que los individuos infectados por el VIH-1 tienen más tendencia a desarrollar la enfermedad tuberculosa a partir de una infección latente que aquellos que no han sido afectados por el virus <sup>75-76</sup>. Los enfermos infectados por el VIH-1 que contraen la tuberculosis desarrollan, a menudo, una enfermedad rápidamente progresiva <sup>79,80</sup>.

En términos generales los niños son contagiados por los adultos infectados de tuberculosis pulmonar evolutiva cuyo examen directo del esputo es positivo. De acuerdo a estimaciones de la OMS, en 1990 hubo 1.3 millones nuevos casos de tuberculosis en menores de 15 años, de los cuales 450 mil habían tenido una evolución fatal <sup>81</sup>. No obstante estos reportes los datos sobre el impacto de la infección por el VIH-1 sobre la tuberculosis del niño son limitados.

Varias técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos han sido desarrolladas para el diagnóstico de la tuberculosis en el adulto pero poco estudiadas en el paciente pediátrico. La más estudiada en este sentido es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que teóricamente es capaz de detectar un bacilo en una toma biológica, esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad superior al 90% en pacientes adultos <sup>82</sup>.

A nivel molecular existen mecanismos celulares que favorecen o evitan la diseminación de la infección por el VIH-1 y las micobacterias, en este sentido se encuentra el fenómeno de apoptosis que en el caso de algunas especies de *Mycobacterium* la inhibición de este mecanismo facilita que la infección por *Mycobacterium* continúe y esto favorezca la asociación de VIH-1 y tuberculosis en las células pulmonares de estos enfermos <sup>71</sup>.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico caracterizado por cambios morfológicos específicos y degradación internucleosomal del DNA <sup>83</sup>. Este mecanismo de muerte celular puede considerarse un mecanismo de defensa contra infecciones por microorganismos intracelulares pues evita el ensamblaje de partículas virales y la diseminación de bacterias.

En el caso de las infecciones virales puede constituir un mecanismo de defensa de la célula anfitriona existen moléculas que inducen apoptosis y moléculas que inhiben el desarrollo de la misma. En el caso del VIH-1 se ha observado que la proteína gp120 se entrecruza con el receptor CD4 en la superficie de las células infectadas lo que produce cambios conformacionales en ambas proteínas (la viral y la celular) siendo este el



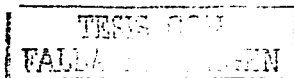


estímulo o señalización para que se desencadenen las "señales" apoptóticas. También se ha demostrado que la infección por el VIH-1 en las células CD4<sup>+</sup> induce la muerte celular a través del desarrollo de células gigantes formadoras de sincicios<sup>64</sup>.

### **Oxido Nítrico.**

El NO es un radical libre que a bajas concentraciones tiene funciones de señalización en diversos procesos fisiológicos que incluyen el control de la presión arterial, neurotransmisión, aprendizaje y memoria. Sin embargo, en altas concentraciones el NO tiene actividades citotóxicas<sup>65,66</sup>. El NO se produce en los sistemas biológicos mediante la acción de las óxido nítrico sintasas (NOS). Para evitar confusiones sobre su denominación, cabe aclarar que las enzimas que catalizan reacciones sintéticas con la concomitante hidrólisis de nucleósidos trifosfatos se denominan "ligasas" o "sintetasas", en tanto que las que no lo hacen se denominan "sintasas"<sup>67</sup>. Estas enzimas producen NO mediante la oxidación de L-arginina a L-citrulina requiriendo NADPH y cinco cofactores/grupos prostéticos FAD, FMN, hemo, tetrahidrobiopterina y Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina. Existen tres isoenzimas codificadas por tres genes diferentes y que reciben su nombre de acuerdo a los tejidos donde fueron descritas por primera vez, pero que pueden expresarse en una amplia variedad de estirpes celulares<sup>68</sup>. La óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS o NOS1), la inducible por citocinas (iNOS o NOS2) y la endotelial (eNOS o NOS3). iNOS y nNOS son solubles y tienen localización citosólica, en tanto que eNOS se encuentra asociada a la membrana celular mediante un ácido mirístico en el extremo N-terminal. Estas enzimas son homodímeros, cada monómero tiene tres regiones funcionalmente importantes, el dominio N-terminal con actividad de oxigenasa, el dominio C-terminal con actividad de reductasa y una región central que une calmodulina. La producción de nNOS y eNOS es constitutiva y sintetizan NO de manera dependiente de la cantidad de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Cuando el Ca<sup>2+</sup> se incrementa, a su vez aumenta la calmodulina que se une a eNOS o nNOS generando producción transitoria de NO. En contraste; iNOS es inducible, pero posee mecanismos de control transcripcional, une calmodulina fuertemente de manera Ca<sup>2+</sup> independiente por lo que produce concentraciones mayores de NO de manera más prolongada no vinculada a los cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular<sup>68</sup>.

El NO juega un papel esencial en la respuesta inmune mediada por células ante la infección por microorganismos intracelulares no solo por su actividad microbicida, pues es capaz de incrementar el consumo de glucosa en los mononucleares de sangre periférica a través del incremento en la permeabilidad celular a través de quinasas y fosfatasa y estimulación del factor nuclear NF- $\kappa$ B.



## JUSTIFICACIÓN:

En la clínica de SIDA en niños del Hospital de Infectología del CMN "La Raza" a lo largo de 12 años, se ha tenido la oportunidad de estudiar 320 pacientes pediátricos con diagnóstico de infección por el VIH-1. Las edades de estos pacientes oscilan desde la etapa neonatal hasta adolescentes de 16 años. En el periodo comprendido de 1996-1998, se incrementó el número de casos de niños con infección por el VIH-1 y tuberculosis, de un total de 72 pacientes, 32 (44%) presentaron tuberculosis con patrón de distribución miliar, así mismo el rango de edad fue de 20 a 36 meses, al efectuárseles estudio de contactos familiares en todos el mismo fue negativo, motivo por el que se decidió investigar la función de las células pulmonares de estos pacientes.

*Mycobacterium tuberculosis* y VIH-1 son dos patógenos intracelulares que tienen capacidad de infectar a los macrófagos, afectar sus funciones y utilizarlos como reservorios. La coinfección por ambos patógenos tiene un efecto sinérgico que altera profundamente las funciones del sistema inmunológico y se asocia con un riesgo muy incrementado de muerte, razón por las que se les ha llamado el "dueto maligno" ("the cursed duet")<sup>83</sup>. Las alteraciones inmunológicas de los pacientes que cursan con coinfección incluyen reducción en la respuesta de tipo Th1 caracterizada por producción disminuida de IFN- $\gamma$  y aumento de TGF- $\beta$  y disminución de células efectoras por apoptosis por aumento en la expresión de CD95, reducción en la capacidad de activación de linfocitos por falla en la expresión de CD28, con refractaria del linfocito T o tendencia a presentar AICD (activation induced cell death) y decremento en la producción de iNOS por macrófagos<sup>93-95</sup>. Sin embargo, no se ha reportado si éstas son semejantes en pacientes con SIDA perinatal, donde la inmunodeficiencia se presenta muy tempranamente, durante el proceso de maduración del sistema inmunológico.

Consecuentemente, en este estudio se pretende establecer en niños que cursen con coinfección por VIH-1 y *M tuberculosis*, la tendencia de las células de lavado broncoalveolar (LBA) a sufrir apoptosis y correlacionarlo con su grado de activación, medido por la producción de iNOS. Considerando que la iNOS es una enzima preferentemente producida por macrófagos y que estas células son las más abundantes en los LBA, asumimos que estos estudios pueden sugerir algunas funciones de éstas células; pero, será necesario hacer estudios más profundos para detallar los efectos de la coinfección sobre los macrófagos alveolares.

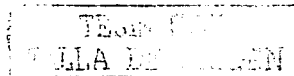
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:**

- 1) ¿Existe VIH-1 en el LBA de los niños con SIDA perinatal?
- 2) ¿Existe diferencia en la expresión de iNOS en las células de LBA de los pacientes con SIDA más tuberculosis comparados con pacientes solo con SIDA?
- 3) ¿Existe diferencia en la susceptibilidad a apoptosis en las células de LBA de los pacientes con SIDA más tuberculosis comparados con pacientes solo con SIDA?

### **OBJETIVOS**

1. Investigar la presencia del VIH en células de LBA de niños con SIDA perinatal.
2. Determinar la expresión de iNOS en células de LBA de pacientes con SIDA perinatal, SIDA más tuberculosis y tuberculosis en comparación con las células de LBA de niños sanos.
2. Comparar la proporción de células apoptóticas en LBA provenientes de los pacientes con infección perinatal por el VIH-1 contra células pulmonares de niños sanos, niños con SIDA y tuberculosis y células pulmonares de niños con tuberculosis pulmonar



## **HIPOTESIS (general):**

La coinfección por VIH-1 y *M. tuberculosis* en niños induce profundos trastornos del sistema inmunológico. La falla en la cooperación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> trae como consecuencia una activación ineficiente de los macrófagos pulmonares que se manifiesta por incapacidad para producir NO y tendencia a sufrir apoptosis. Estos fenómenos tienen un papel importante en la fisiopatología de ambas infecciones, pues promueven la diseminación bacteriana y viral. Por lo tanto, debe existir diferencia en la expresión de iNOS y la proporción de apoptosis en células de LBA de estos pacientes, en comparación con las células de LBA de niños sanos y niños con tuberculosis.

### **Hipótesis 1:**

Es posible identificar VIH-1 a partir de células de LBA de niños con SIDA perinatal, estas células pueden constituir un reservorio viral.

### **Hipótesis 2:**

La coinfección por *M. tuberculosis* y VIH-1 afecta la capacidad de activación de macrófagos alveolares, por tanto se espera que la expresión de iNOS será menor en células de LBA de niños con SIDA perinatal más tuberculosis, en comparación con células de niños solo con tuberculosis o SIDA.

### **Hipótesis 3:**

La proporción de células en apoptosis de los LBA será mayor en niños que cursen con SIDA más tuberculosis, en comparación con aquellos que tengan solo SIDA o solo tuberculosis.

## **DISEÑO DEL ESTUDIO :**

Tipo de estudio: Clínico Básico. El diagrama de flujo de trabajo se presenta en la Figura No. 1.

1. Por el control de la maniobra: Cuasiexperimental.
2. Por la presencia de grupo control: Comparativo.
3. Por la asignación de sujetos: Antes y después con grupo de control no equivalente.
4. Por la captación de la información: Prospectivo y longitudinal.
5. Por la no ceguedad en la maniobra: Abierto.

## **VARIABLES:**

### **Independiente.**

Infección por VIH-1, VIH-1 y *M. tuberculosis* o *M. tuberculosis* sin VIH-1.

### **Dependientes.**

Proporción de células de LBA apoptóticas antes de activar con PMA.

Proporción de células de LBA apoptóticas después de activar con PMA.

Cantidad del transcrito de iNOS que producen las células de LBA después de ser activadas con PMA.



## DEFINICIÓN CONCEPTUAL DE LAS VARIABLES:

Infección por VIH-1. Presencia del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 en células humanas con receptor CD4<sup>+</sup>

Infección por VIH-1 y *M. tuberculosis*: Presencia del VIH-1 en células humanas con receptor CD4<sup>+</sup>, presencia de *M. tuberculosis* en células pulmonares

**Apoptosis:** Muerte celular programada, caracterizada por cambios morfológicos específicos (contracción de la membrana celular, condensación de la cromatina y fragmentación celular de pequeñas partículas denominadas cuerpos apoptóticos, es posible medirla por fluorescencia, a través de la técnica denominada TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick – End Labeling) <sup>16</sup>.

**Lavado broncoalveolar (LBA):** Líquido con diferentes estirpes celulares principalmente macrófagos y monocitos que forman parte de los mecanismos intrínsecos de defensa del pulmón, que se obtiene mediante la instilación y aspiración de solución salina en los bronquios utilizando un broncoscopio.

***M. tuberculosis*:** Bacteria ácido alcohol resistente causante de la entidad clínica denominada tuberculosis.

**OXIDO NITRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS):** Enzima producida principalmente por macrófagos activados que participa en la destrucción de patógenos intracelulares.

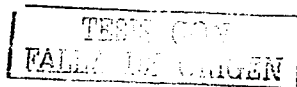
## Parámetros de medición e indicadores:

Tipos de variables:

Objetivo 1 categórica : Positivo o negativo

Objetivo 2 discreta : Proporción de células en apoptosis

Objetivo 3 discreta : Expresión de iNOS con respecto a una proteína que se expresa de manera constitutiva. Razón iNOS/ $\beta$ -Actina



## MATERIAL Y METODOS

**Población de estudio.** Niños de 0 a 13 años de edad con infección perinatal por VIH, de cualquier sexo, niños con SIDA y tuberculosis, niños con tuberculosis sin SIDA y niños controles sin SIDA, con carta de consentimiento informado firmada por el padre, madre o tutor. No se incluyeron niños con tratamiento inmunosupresor y/o esteroideo, en quienes por los métodos anteriores no fue posible sustentar tuberculosis. Niños cuyo padre, madre o tutor no haya firmado carta de consentimiento informado para que el menor participara en el estudio, o bien que el menor o sus tutores se rehusaran a participar en el mismo.

**Grupo 1.** Se captaron niños de la consulta externa de la clínica de SIDA del Hospital de Infectología del CMN "La Raza" con el diagnóstico de infección por VIH-1 sin evidencia de tuberculosis, diagnóstico de SIDA perinatal en etapa C2 y C3 de la infección de acuerdo a la clasificación del CDC (Atlanta, USA) de SIDA en Pediatría. No progresión de peso y talla en el transcurso de 3 meses consecutivos, sin evidencia de infección agregada.

**Grupo 2.** Se captaron niños de la consulta externa de la clínica de SIDA del Hospital de Infectología del CMN "La Raza" con el diagnóstico de infección por VIH-1 con diagnóstico de tuberculosis pulmonar con cultivo o PCR positiva en LBA para *M. tuberculosis* o con cuadro clínico y radiológico de tuberculosis.

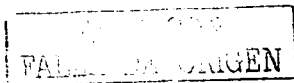
**Grupo 3.** En el Servicio de Neumología Pediátrica del Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" del CMN "La Raza" se captaron niños con tuberculosis pulmonar pero sin infección por el VIH-1.

**Grupo 4** En el Servicio de Endoscopias Pediátricas del Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" del CMN "La Raza" se obtuvieron LBA de niños que ingresaron al servicio refendo para algún procedimiento broncoscópico (vgr. cuerpo extraño de la vía aérea) éstos últimos fueron los controles negativos para SIDA y tuberculosis.

**Obtención de células de LBA.** Se colectaron células pulmonares de LBA utilizando un fibroscopio rígido pediátrico (Olimpus M-902), con diámetro externo de 3 mm. El procedimiento se llevó a cabo bajo sedación con midazolam 100 µg/kg de peso. Se instiló 1 ml de solución salina al 0.9%/kg a temperatura ambiente y se recolectaron en tubos plástico de 15 ml. Las células se cosecharon por centrifugación a 1200 rpm y se lavaron 2 veces con PBS a temperatura ambiente, se resuspendieron en 10 ml de PBS, se evaluó su viabilidad mediante tinción con azul de tripano, se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron a  $5 \times 10^6$  células/ml resuspendiéndolas en 5 ml de PBS. Tanto las células como los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### Detección de infección por VIH-1 en células de LBA.

Con el propósito de establecer si las células de LBA de los pacientes con SIDA o SIDA y tuberculosis se encontraban infectadas por el VIH-1 se realizaron tres ensayos diferentes. Se identificó DNA proviral del gen *gag* mediante PCR anidada, se identificó RNA mediante RT-PCR de sobrenadantes de LBA, se realizó cocultivo y determinación de antígeno p24 para precisar la capacidad infectante de las partículas virales. Para



demostrar que los métodos de amplificación de DNA proviral y detección de RNA viral funcionaban adecuadamente, se identificó el gen *gag* mediante PCR anidada y RT-PCR a partir de células mononucleares de en pacientes conocidos con SIDA y testigos sanos utilizando los métodos que se describen a continuación.

#### **Obtención de ácidos nucleicos.**

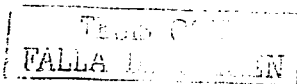
Se purificó DNA usando TRIzol (GIBCO, BRL) de acuerdo a la técnica previamente descrita<sup>97</sup>. Brevemente, se adicionó 500  $\mu$ l de TRIzol al botón celular de los LBA, al homogeneizado se agregaron 100  $\mu$ l de cloroformo y se mezcló después de 3 min, las muestras se centrifugaron a 14 000 xg, 15 min a 4°C. se eliminó el sobrenadante. Luego se adicionaron 150  $\mu$ l de etanol al 100%, se incubó 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 7500 rpm 5 min a 4 °C y el botón se lavó con 100  $\mu$ l de citrato de sodio al 0.1M en 2 ocasiones por 30 minutos en rotor de velocidad variable. El DNA fue resuspendido en etanol al 75% y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min , nuevamente se centrifugó a 7500 rpm 5 min a 4 °C, posteriormente se secó y se resuspendió en NaOH 8 mM. El DNA se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm.

El RNA total se purificó usando TRIzol (GIBCO, BRL) de acuerdo a la técnica previamente descrita<sup>97</sup>. Brevemente, se adicionó 1 ml de TRIzol del botón celular de los LBA, al homogeneizado se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se mezcló después de 3 min, las muestras se centrifugaron a 12 000 xg, 20 min a 4°C. Posteriormente, la fase acuosa se recuperó en un tubo limpio al cual se le adicionó 500 $\mu$ l de isopropanol, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 15 min. Después de este tiempo las muestras se centrifugaron a 12 000 xg por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón fue lavado con 1 ml de etanol al 75%. El RNA fue resuspendido en 30  $\mu$ l de agua tratada con DEPC y se incubó a 65°C durante 20 min. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm.

#### **Amplificación de DNA proviral y RNA de VIH.1.**

Se detectó DNA proviral y RNA de VIH-1 a partir de células y sobrenadantes de LBA por PCR y RT-PCR, respectivamente.

Los ácidos nucleicos se obtuvieron de acuerdo a los métodos descritos en el punto anterior. Para la amplificación de DNA se realizó mediante PCR anidada utilizando los siguientes iniciadores de secuencia ("primers") del gen *gag*: Gag1 5'-TCC ACC TAT CCC AAGT AGG AG-3'; Gag2 5'-GGT CGT TGC CAA AGA GTG AT-3'; sentido Gag2a 5'-TAA AAG ATG GAT AAT CCT GGG-3'; Gag3a, 5'-GCC AAA GAG TGA TCT GAG GG-3' , que corresponden a las posiciones 1565, 2280, 1591 y 2273, respectivamente, del gen *gag* en la clona HXBs (número de acceso en el banco de genes de NCBI AY2628330 gi30720405). La amplificación se realizó utilizando la siguiente mezcla de reacción: dNTPs 0.2mM, Tris HCl 10 mM, KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, AmpTaq-Pol (5U/ $\mu$ l) 1.25 U y 0.2 $\mu$ M de iniciadores de secuencia Gag 5'2a y Gag 3'2a en un volumen final de reacción de 45  $\mu$ l en un termociclador Perkin Elmer gene amp PCR system 2400. Con el siguiente protocolo: desnaturalización 94 °C 2 min, 3 ciclos de desnaturalización 94 °C 10 seg, alineamiento 55 °C 10 seg y extensión 72 °C 30 seg, y



32 ciclos de desnaturalización 94 °C 10 seg, alineamiento 60 °C 10 seg y extensión 72 °C 30 seg, y un ciclo final de 72 °C 30 seg. De la primera amplificación con los iniciadores de secuencia Gag1 y Gag2 resultó un producto de 715 pb. La segunda amplificación se realizó a partir de 3,0 µL del producto de la primera PCR siguiendo el perfil de temperaturas y reactantes indicado previamente utilizando los iniciadores de secuencia Gag2a y Gag3a, resultando un producto de 682 pb (Figura No. 2). Una vez terminada la amplificación los productos se visualizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2% en amortiguador TBE1X.

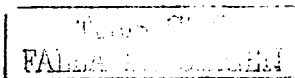
Para la detección de RNA se utilizó RT-PCR, la retrotranscripción se realizó mezclando en el tubo micro-amp la cantidad de RNA, 10 µL de cada iniciador y 5 µL de amortiguador para RT, dNTPs 0.2mM c/u, MoMuLV RT4U, AmpliTaq-Pol (5U/µl) 1.25U, en un volumen final de 45 µl. Se realizó una primera hibridación a 65°C durante 10 min y se incubó a 42°C durante 60 min al final de los cuales se continuó con las temperaturas y tiempos de amplificación descritos anteriormente. A final de la primera amplificación, 5 µL del producto se utilizaron para la segunda amplificación como se describe previamente y los productos se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa teñida con bromuro de etidio.

**Cocultivo de VIH-1.** Se investigó la presencia de partículas virales viables de VIH-1 en LBA por su capacidad de infectar *in vitro* células mononucleares de donadores sanos. Células de LBA de los pacientes con SIDA se obtuvieron como se describe arriba y se cocultivaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de personas sanas, purificadas mediante un gradiente de Ficoll y previamente activadas durante 48 hrs con PHA.

Para establecer el cocultivo se colocaron alrededor de  $5 \times 10^4$  células de LBA en un frasco de cultivo en aproximadamente 4 ml de medio RPMI con 10% de SBF +10 U/ml de IL-2, añadiendo aproximadamente  $1 \times 10^7$  PBMC-PHA pretratados de individuos sanos suspendidos también en aproximadamente 4ml. El volumen final de este cocultivo fue de 8ml.

Las células se alimentaron cinco veces a la semana, retirando aproximadamente la mitad del medio y reemplazándolo con medio fresco en todos los suplementos. Cada 10 días se adicionaron  $5 \times 10^6$  PBMC normales activados con PHA. Los frascos de cultivo de mantuvieron en forma horizontal hasta alcanzar crecimiento logarítmico ( $5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^9$  células/ml, cuando el cultivo alcanzaba densidades óptimas fue factible subcultivar el mismo.

Para dar seguimiento a la infección se transfirió un ml de sobrenadante de cultivo a un tubo Eppendorf los días 3,7,14,21 y 28 y se congelaron a -70 °C hasta la determinación de antígeno p24 por ELISA de acuerdo a las recomendaciones del productor (Sanofi-Pasteur). Para considerar positivo un cultivo se requirieron al menos de 2 determinaciones de antígeno positivas, el segundo con valores superiores al primero.





**Detección de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*.** La determinación de DNA de *M. tuberculosis* se realizó por PCR y PCR-anidada. A partir de células de LBA, el DNA fue aislado usando TRIZOL (GIBCO, BRL) de acuerdo a la técnica descrita en el punto anterior <sup>97</sup>. La primera amplificación por PCR se realizó utilizando oligonucleótidos específicos para *M. tuberculosis* de acuerdo a las secuencias y el programa de amplificación previamente descritos <sup>98,99</sup> en un termociclador (AMPLITRON II). Brevemente, primero se realizó una desnaturalización a 94 °C 1 min, un ciclo; 35 ciclos utilizando el siguiente programa: 94°C por 60 seg.; 71°C por 2 min; 72°C por 3 min, y una extensión final a 72 °C 10 min un ciclo. La secuencia de oligonucleótidos fue la siguiente: MT1 5' TTC CTG ACC AGC GAG CTG CCG 3', MT2 5' CCC CAG TAC TCC CAG CTG TGC 3', IS5 5' CGG AGA CGG TGC GTA AGT GG3', IS6 5' GAT GGA CCG CCA GGG CTT GC 3', PT1 5' CAA GGC GCC GTC GGT GG 3', PT2 5' CCC CCC ACC GCA CCG C 3' y PT3 5' CAC CAC GTT CGG GAT GCA CTGC 3', PT4 5' CTG ATG TGC TCC GAC ACG TTCC 3'. Los iniciadores de secuencia MT1 y MT2 amplifican un fragmento de 506 bp del antígeno  $\alpha$  (número de acceso en el banco de genes de NCBI X98154 gi2673860), los iniciadores de secuencia IS5 e IS6 amplifican un fragmento de 989 bp de la secuencia de inserción IS6110 (número de acceso en el banco de genes de NCBI Af39039S1 gi15430108), los iniciadores de secuencia PT1 y PT2 amplifican un fragmento de 401 bp del antígeno mtp40, y los iniciadores de secuencia PT3 y PT4 amplifican un fragmento interno de 222 bp del producto de PT1 y PT2 (número de acceso en el banco de genes de NCBI S69737 gi516582) (Figuras No. 3 a 5). Una vez realizada la amplificación, 15  $\mu$ l de los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio.

**Detección de iNOS.** La detección de la iNOS se realizó mediante RT-PCR a partir de células de LBA previamente cultivadas en RPMI con 10% de SFB estimuladas durante 48hs con PMA (80 ng/ml). Los ácidos nucleicos se purificaron como se describe en un punto anterior. La primera cadena de cDNA fue generada mediante transcripción reversa (RT) utilizando RT-AMV (Roche Molecular Biochemicals, La Jolla, CA, USA) y mezcla de hexanucleótidos (Roche) a partir de 1  $\mu$ g de RNA total en 20  $\mu$ l de mezcla de reacción. El producto de la retrotranscripción fue utilizado como molde para la amplificación por PCR en un termociclador (AMPLITON II), usando oligonucleótidos específicos para iNOS en humanos y  $\beta$ -actina por 40 ciclos utilizando el programa (94°C por 30 seg.; 57°C por 1 min; 72°C por 1.5 min.), de acuerdo a las secuencias de oligonucleótidos y el programa de amplificación previamente descritos <sup>98,99</sup>. La secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de iNOS fueron NOS-1 5' CTG TCC TTG GAA ATT TCT GTT3' y NOS-2 5' TGG CCA GAT GTT CCT CTA TT3', que corresponden a las posiciones 270 y 757 de acuerdo al banco de genes del NCBI (NM\_153292 gi.24041031) con un producto esperado de 488 pb. Los iniciadores para la amplificación de la  $\beta$ -actina fueron 5' BetaAct-1 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3' y, BetaAct-2 5' CTG CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC3', que corresponden a las posiciones 235 y 716 de acuerdo al banco de genes de NCBI (NM\_0011101 gi.5016088) con un producto esperado de 481 pb (Figuras No. 6 y 7). Quince  $\mu$ l de los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con



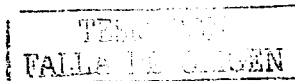
bromuro de etidio. La amplificación del molde sin enzima RT-AMV en cada reacción se utilizó como control negativo de PCR. La expresión de la  $\beta$ -actina fue usada como control de la integridad y cantidad del RNA. Se realizó análisis densitométrico de los productos de PCR mediante el programa Kodak® Digital Science ID, versión 2.0.2 para Windows®, calculando la razón iNOS/ $\beta$ -actina.

#### **Cuantificación de células apoptóticas.**

Las células de LBA se cosecharon como se describió anteriormente, se lavaron dos veces con RPMI-1640 suplementado con SFB al 5% se contaron las células en una cámara de Neubauer utilizando azul tripano para observar viabilidad celular. Para el control de células sin activar una parte de células obtenidas se utilizó para hacer frotis (10 mil células/frotis), los cuales fueron almacenadas a 4 C hasta su uso. Las células restantes fueron ajustadas  $4 \times 10^4$  células/ml y puestas en cultivo en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% en placas de 12 pozos las cuales contenían en el fondo un cubreobjetos, se le adicionó al cultivo PMA (80 nM) y se incubó durante 48 h y a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a las células se les removió el medio, se lavaron con 500  $\mu$ l de PBS-1% BSA en 3 ocasiones. El cubreobjetos fue recuperado y las células adheridas fueron fijadas con una solución al 4% de formaldehído y se incubaron a temperatura ambiente durante media hora. Las células en apoptosis se determinaron por la técnica de TUNEL<sup>96</sup> (Figura No. 8) de acuerdo a las recomendaciones del productor (Pharmingen). Posteriormente, se observaron a microscopia de fluorescencia (Olimpus BX40) y se contaron 10 campos determinando la proporción de células fluorescentes. Como controles se utilizaron células IC21 (línea celular murina de macrófagos). Estas células son adherentes por lo que se despegaron de la caja de medio de cultivo con PBS-EDTA (20ml). Una vez despegadas las células de la botella se pasaron a un tubo Falcon de 50ml, se centrifugaron 7 min. a 1,200 rpm (4 Xg). Una vez centrifugadas, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 15ml de medio RPMI-1640 al 10% de SFB. Las células se contaron y ajustaron a  $4 \times 10^4$  células/ml y puestas en cultivo en 1 ml de RPMI con 10 % de SFB en placas de 12 pozos las cuales contiene un portaobjetos en el fondo. Para inducir apoptosis se utilizó LPS y se incubó durante 48 hrs a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

#### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron utilizando el programa SPSS ver 10 para Windows®. Se determinó la existencia de diferencias significativas para la razón iNOS/ $\beta$ -Actina y para la proporción de células apoptóticas, utilizando las pruebas no paramétricas de rangos de Kruskal-Wallis para todos los grupos y la diferencia entre grupos se determinó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras.



## RESULTADOS.

### Descripción de los pacientes.

Con el propósito de obtener información sobre el estado funcional de las células pulmonares en pacientes con SIDA perinatal y coinfección por *M. tuberculosis*, se comparó la producción de iNOS y la propensión a desarrollar apoptosis con pacientes solo con SIDA, solo con tuberculosis, así como a la asociación de SIDA con tuberculosis.

Se estudiaron un total de 18 pacientes cuyas características generales se presentan en la Tabla No. 1. Cinco con diagnóstico de SIDA perinatal (grupo 1), 3 con SIDA y tuberculosis (grupo 2) y 3 con tuberculosis sin SIDA (grupo 3). El grupo control (grupo 4) estuvo formado por 7 niños sanos que fueron atendidos en el Servicio de Endoscopías Pediátricas del Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" del CMN "La Raza" que ingresaron para broncoscopia por cuerpo extraño de la vía aérea. Todos los pacientes con tuberculosis (seis) tuvieron PCR positiva para *M. tuberculosis* realizada en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología (Figura No 9), tanto los pacientes solo con SIDA, como los pacientes testigo tuvieron PCR negativa para *M. tuberculosis* (datos no mostrados). Los pacientes con SIDA y SIDA más tuberculosis se reclutaron de la consulta externa de la Clínica de SIDA en niños del Hospital de Infectología del CMN "La Raza", donde se realizó la exploración física completa, considerando el índice antropométrico para asegurar que ninguno de ellos tuviera algún grado de desnutrición y que éste fuera un factor que favoreciera alteración en la función de células pulmonares. Todos los niños se encontraron en la categoría C2 y C3 de la infección de acuerdo a la clasificación del CDC de Atlanta, USA<sup>100,101</sup>. El tratamiento antirretroviral que se encontraban recibiendo los pacientes eran los siguientes: AZT + Lamivudina + Ritonavir®. Al momento del estudio todos los pacientes se encontraban asintomáticos. Los pacientes con SIDA y tuberculosis (grupo 2) recibían tratamiento con AZT + Lamivudina + Saquinavir® (se substituyó el Ritonavir por la interacción farmacológica con la Rifampicina. El tratamiento antimicótico fue con: HAIN, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol. Los pacientes con tuberculosis sin evidencia de infección por VIH (grupo 3) recibieron Rifampicina, HAIN y Pirazinamida (Tabla No. 2)

### Detección de DNA proviral de VIH-1 y RNA de VIH-1 en células o sobrenadante de LBA.

Se determinó DNA proviral y RNA de VIH-1 a partir de células o sobrenadante de LBA. En los 5 pacientes con SIDA (grupo 1) y los 3 pacientes con SIDA y tuberculosis (grupo 2) se amplificó DNA proviral a partir de células o sobrenadante de LBA. Solo en uno de los tres pacientes con SIDA y tuberculosis fue posible amplificar DNA proviral en células de LBA (Figura No. 10). Esta aparente discordancia en los resultados se puede explicar por el número de células utilizadas para la amplificación de DNA proviral. Se recomienda amplificar DNA proviral a partir de  $1 \times 10^8$  células y estos experimentos se realizaron con un menor número de células debido al poco rendimiento que se obtuvo a partir del LBA. En todos los pacientes con SIDA (ocho) se realizó cocultivo de las células de LBA con leucocitos de personas sanas y determinación de antígeno p24 para evaluar la capacidad infectante de las partículas virales. En ninguno de ellos fue posible

TABLE 1. ORIGINAL

identificar antígeno p24 hasta el día 28 de cultivo, estos hallazgos sugieren que no hay replicación del VIH-1 en estas células. Sin embargo, el haber detectado VIH-1 en LBA sugiere que el pulmón puede ser reservorio viral.

#### **Detección de iNOS.**

Para demostrar que el método de detección de iNOS mediante RT-PCR funcionaba adecuadamente, se realizaron ensayos utilizando leucocitos mononucleares de personas sanas, de sangre periférica y estimuladas con PMA (Figura No. 11 ). La amplificación de la iNOS en los cuatro grupos experimentales se realizó en las células de LBA estimuladas con PMA, utilizando como medida de comparación el transcrito de  $\beta$ -actina (Figura No. 11 D y E, Tabla No. 3). Se determinó la razón iNOS/ $\beta$ -actina de la intensidad de las bandas para tener una medición semi-cuantitativa mediante análisis densitométrico de los productos de amplificación, el cual se presenta en la Figura No. 12. Los tres grupos de pacientes (SIDA, SIDA + TBP y TBP) producen menor cantidad del transcrito de iNOS con respecto al control de niños sanos ( $P = 0.037$ ). Sin embargo, al comparar cada grupo por separado solo los pacientes con SIDA + TBP presentan diferencias significativas con respecto al control ( $P = 0.03$ ). Considerando que la iNOS es una enzima se produce principalmente en macrófagos y que estas células son abundantes en LBA, es posible conjeturar que no se activan de manera adecuada en los tres grupos de pacientes, pero el efecto parece ser mayor en los pacientes con coinfección. Sin embargo, el reducido número de pacientes impide tener fuerza en esta hipótesis.

#### **Determinación de apoptosis en células de LBA.**

El método para determinar células en apoptosis mediante TUNEL se evaluó primeramente utilizando células IC21 estimuladas con PMA. La Figura No. 13C muestra una microfotografía de fluorescencia donde es posible apreciar células en apoptosis. Los grupos de pacientes se ensayaron de la misma manera y los resultados se presentan en la Tabla No. 4. En las células de todos los grupos se encontró apoptosis previa a la estimulación con PMA. Sin embargo, los pacientes parecen tener una apoptosis espontánea mayor en comparación con el grupo control ( $P = 0.006$ ). La apoptosis después de estimular con PMA fue mayor en el grupo de niños con tuberculosis ( $P = 0.017$ ). Aunque solo se observó un efecto importante de incremento de apoptosis después de la estimulación con PMA en un paciente con SIDA + TBP y en este grupo no hay diferencias significativas con respecto al control ( $P = 0.612$ ), esta discrepancia con respecto a lo esperado se debe probablemente al bajo número de pacientes estudiados. Sin embargo, estos datos en conjunto sugieren que las células de LBA de los pacientes con VIH-1 o *M. tuberculosis* tienden a ser más susceptibles a la muerte celular programada, aunque no es posible elucidar el mecanismo (Figura No. 14).



## DISCUSIÓN:

Con el propósito de estudiar el estado funcional de las células de LBA de pacientes con coinfección por VIH-1 y *Mycobacterium tuberculosis*, como primer paso se amplificó DNA proviral de muestras de LBA. Los resultados observados mostraron que existe VIH-1 en sobrenadantes de LBA en los niños con infección por VIH, situación que sugiere que este compartimiento es un reservorio del VIH-1 en población infantil. Es importante señalar que no fue posible amplificar DNA proviral a partir de células de LBA, a excepción de un paciente que presentó coinfección por VIH-1 y *M. tuberculosis*. Este resultado podría ser explicado en parte porque la cantidad de células de LBA utilizadas para la búsqueda del gen *gag* no fue suficiente. El límite de detección requiere de  $1 \times 10^5$  células y en la mayoría de los pacientes el ensayo se realizó con menor número de células. Por otro lado, la alta proporción de células apoptóticas sugiere que en todos los pacientes con SIDA existe una tasa de destrucción celular muy alta con liberación de material genético al medio. Esta observación es consistente con el hecho de que en ningún paciente fue posible demostrar partículas virales infectantes en células de LBA.

La baja producción del transcrito de iNOS en pacientes con SIDA, SIDA más tuberculosis y tuberculosis con relación a los controles sanos sugiere que las células de LBA, específicamente los macrófagos, se encuentran en un estado refractario a la activación, aunque este estudio tiene la limitación de que no se diseñó para identificar a los macrófagos alveolares mediante marcadores como CD11 o CD14. Por otro lado, los resultados de medición de apoptosis son consistentes con las observaciones de otros autores y sugieren además que las células son susceptibles a muerte celular programada<sup>94,102</sup>.

Debe considerarse que el mecanismo de protección contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis* implica la participación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  que promueven la activación de los macrófagos y la formación del granuloma, como manifestación de hipersensibilidad retardada y que los pacientes con SIDA y tuberculosis tiene alteraciones inmunológicas importantes<sup>92</sup>. La mayoría de los estudios concuerda en que la falta de activación de los macrófagos alveolares se debe a una falta cuantitativa y cualitativa de linfocitos cooperadores en el micro-ambiente pulmonar. Así, a partir células de LBA de pacientes adultos que cursan con coinfección por VIH-1 y *Mycobacterium tuberculosis* se ha descrito, que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> expresan CD95 con disminución de CD28 y producen menores cantidades de IFN- $\gamma$ <sup>91</sup>, que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> también producen menos IFN- $\gamma$ <sup>92</sup>.

Los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  se convierten en potentes células efectoras con acción antimicrobiana pues se generan reactivos de oxígeno y NO. En este estudio se observó que la menor producción de iNOS se presentó en el grupo de células de LBA de pacientes en los que coexistía infección por VIH-1 y *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha demostrado que *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de incrementar la apoptosis de macrófagos alveolares de pacientes con infección por VIH-1<sup>94</sup>, aumentar la



replicación viral dentro de los macrófagos y la expresión de CCR5<sup>89</sup> así como la producción de citocinas inmunosupresoras como TGF- $\beta$  e IL-10<sup>95</sup>.

Este estudio adolece de diversas limitaciones experimentales. En primer lugar debe destacarse la dificultad técnica y ética para obtener muestras de LBA en pacientes pediátricos, las cuales frecuentemente se contaminan o tienen gran cantidad de moco y que resultan en un rendimiento bajo de células debido también al poco volumen de líquido que se puede utilizar para instilar a los pacientes. De hecho, hasta donde tenemos conocimiento, no existe en la literatura algún reporte del estado funcional de las células de LBA en pacientes con SIDA perinatal. Por ello, el número de pacientes estudiados fue muy limitado. Aunque por el diseño experimental, no existe un tamaño de muestra definido, los datos deben ser tomados con precaución y debe tratarse de aumentar el número de pacientes estudiados. Otra limitación importante es la falta de identificación fenotípica de las células de LBA. Aunque la iNOS es una enzima que se produce principalmente en macrófagos, en este estudio no fue posible identificar a esta población celular. Probablemente, hubiese sido más conveniente utilizar citometría de flujo con doble tinción para células CD14 o C11b positivas y apoptosis. El método de TUNEL puede determinar apoptosis tardía, pero también en fenómenos de necrosis puede haber fragmentación de DNA, por ello se debió haber detectado también la expresión de fosfatidil-senna (PS) en la superficie celular para determinar apoptosis temprana mediante el ensayo de adhesión de Anexina V.

Sin embargo, esta tesis abre la posibilidad de ampliar el estudio funcional de los macrófagos alveolares en pacientes pediátricos con SIDA, pues acuerdo a los resultados, fue posible observar que existe VIH-1 en el LBA de los niños con SIDA perinatal. Se pudo demostrar que la coinfección con VIH-1 más *Mycobacterium tuberculosis* parece provocar menor expresión de iNOS en las células pulmonares en comparación con los otros grupos. El mayor índice apoptótico se apreció en el grupo de células de los niños con infección por el VIH-1 que en el resto. Estos datos en conjunto sugieren que en las células de LBA de niños con SIDA o coinfección con VIH-1 y *M. tuberculosis* existe una mayor susceptibilidad a la apoptosis inducida por activación y una menor capacidad de activación reflejada por una imposibilidad a producir óxido nítrico.

TESIS COMPLETA  
FALLA DE ENTREGA

GRUPO		INICIALES	EDAD (años)*	SEXO	PESO (kg)	TALLA (cm)
1	SIDA	GCE	7	M	19	110
		BBA	5	F	17	105
		RAAI	13	M	42	157
		SSA	6	F	19	116
		CGV	7	F	21	119
2	SIDA + TBP	GBLS	8	F	23	
		PCS	10	F	24	
		PPK	7	F	21	
3	TBP	PRG	13	M	37	153
		CDC	11	F	35	147
		FRS	9	F	39	132
4	CONTROLES	1	9	M	8.7	NO DET.
		2	12	F	9.7	NO DET.
		3	12	M	11	NO DET.
		4	12	M	9.5	NO DET.
		5	14	M	9	NO DET.
		6	15	F	9.8	NO DET.
		7	18	F	12	NO DET.

- La edad de los controles esta expresada en meses.

**Tabla No. 1. . Características generales de los pacientes incluidos en este estudio.**

**Grupo 1.** Niños de la consulta externa de la clínica de SIDA del Hospital de Infectología del CMN "La Raza" con el diagnóstico de infección por VIH-1 sin evidencia de tuberculosis, diagnóstico de SIDA perinatal en etapa C2 y C3 de la infección de acuerdo a la clasificación del CDC (Atlanta, USA) de SIDA en Pediatría. No progresión de peso y talla en el transcurso de 3 meses consecutivos, sin evidencia de infección agregada. **Grupo 2.** Se captaron niños de la consulta externa de la clínica de SIDA del Hospital de Infectología del CMN "La Raza" con el diagnóstico de infección por VIH-1 con diagnóstico de tuberculosis pulmonar con cultivo o PCR positiva en LBA para *M. tuberculosis* o con cuadro clínico y radiológico de tuberculosis.

**Grupo 3.** En el Servicio de Neumología Pediátrica del Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" del CMN "La Raza" se captaron niños y niñas con tuberculosis pulmonar pero sin infección por el VIH-1.

**Grupo 4.** En el Servicio de Endoscopias Pediátricas del Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" del CMN "La Raza" se obtuvieron LBA de niños que ingresaron al servicio referido para algún procedimiento broncoscópico (vgr. cuerpo extraño de la vía aérea) éstos últimos fueron los controles negativos para SIDA y tuberculosis.



25-A

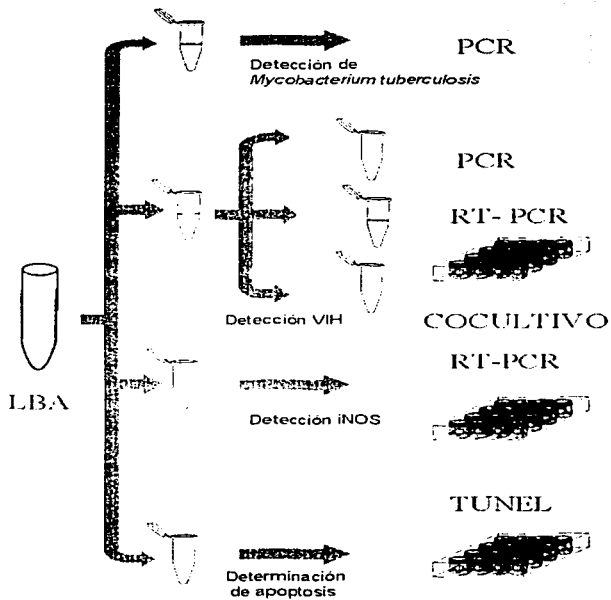


Figura No. 1. Diagrama de trabajo a partir de las muestras de LBA.

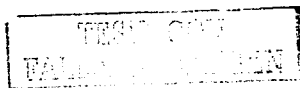
TESTA COM  
FALLA EN GEN

25-B



GRUPO	INICIALES	CARGA VIRAL		LINFOCITOS T CD4+	TRATAMIENTO		
		No. Absoluto	LOG	células./ml	SIDA	TBP	
1	SIDA	GCE	464,000	5.7	960	ABC+DDC+NELFINAVIR	NR
		BBA	Indetectable	Indetectable	350	LMV+NELFINAVIR+RITONAVIR	NR
		RAAI	224,000	5.4	367	ABC+GALETRA	NR
		SSA	66,900	4.8	567	NEVIRAPINA+D4T+NELFINAVIR	NR
		CGV	9,650	4.0	525	NEVIRAPINA+D4T	NR
		GBLS	750,000	5.9	247	DOI+3TC+RITONAVIR	RIFAMPICINA+ETHAMBUTOL
2	SIDA + TBP	PCS	12,400	4.1	293	AZT+3TC+RITONAVIR	HAIN+RIFAMPICINA+ETHAMBUTOL
		PPK	6,500	3.8	227	AZT+3TC+NELFINAVIR	HAIN+RIFAMPICINA+ETHAMBUTOL
		PRG	NR	NR	NR	NR	HAIN+RIFAMPICINA+PIRAZINAMIDA
3	TBP	CDC	NR	NR	NR	NR	HAIN+RIFAMPICINA+PIRAZINAMIDA
		FRS	NR	NR	NR	NR	HAIN+RIFAMPICINA+PIRAZINAMIDA
		1	NR	NR	NR	NR	NR
4	CONTROLES	2	NR	NR	NR	NR	NR
		3	NR	NR	NR	NR	NR
		4	NR	NR	NR	NR	NR
		5	NR	NR	NR	NR	NR
		6	NR	NR	NR	NR	NR
		7	NR	NR	NR	NR	NR

Tabla No. 2- Carga viral, cuenta de linfocitos T CD4+ y tratamiento de los pacientes.



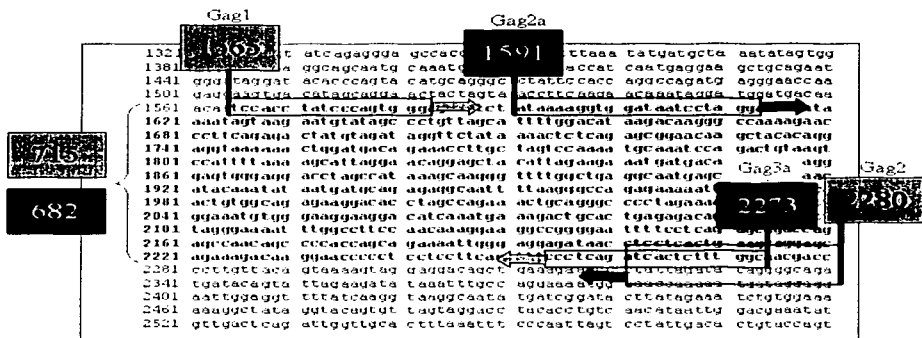
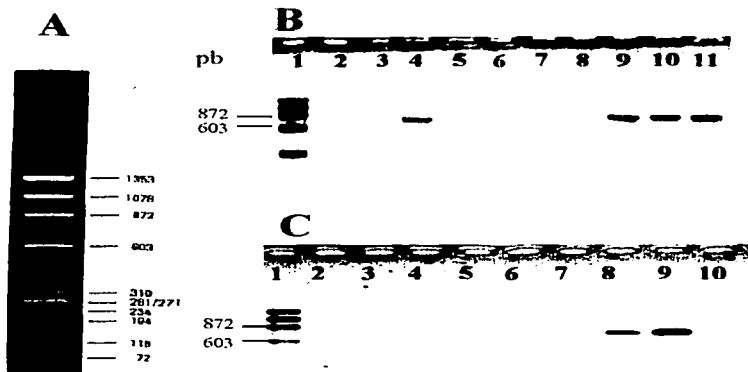


Figura No. 2 Esquema que representa la región que se amplificó del gene *gag* de VIH-1. Los iniciadores Gag1 5'-TCC ACC TAT CCC AAGT AGG AG-3'; Gag2 5'-GGT CGT TGC CAA AGA GTG AT-3'; sentido Gag2a 5'-TAA AAG ATG GAT AAT CCT GGG-3'; Gag3a, 5'-GCC AAA GAG TGA TCT GAG GG-3, corresponden a las posiciones 1565, 2280, 1591 y 2273, respectivamente, del gen *gag* en la clona HXB5, de acuerdo al banco de genes NCB tiene el número de acceso AY2628330 gi30720405. La amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos. La primera amplificación (verde) con los iniciadores de secuencia Gag1 y Gag2 genera un producto de 715 pb. La segunda amplificación (azul) se realizó utilizando los iniciadores Gag2a y Gag3a generando un producto de 682 pb.

TESIS CON  
VALOR DE GRADUACION



**Figura No. 10. Amplificación de DNA proviral y RNA de VIH-1.** Se identificó DNA proviral o RNA de VIH-1 mediante PCR o RT-PCR anidadas, respectivamente, tal y como se describe en materiales y métodos. Los iniciadores Gag1 y Gag2 generan un producto de 715 pb. La segunda amplificación con los iniciadores Gag2a y Gag3a generan un producto de 682 pb. **A.** Marcador de peso molecular IX de DNA de fago X174 digerido con Hae III (Roche, Cat No. 1 449 460), fotografía tomada del catálogo del productor. **B** y **C.** Pacientes después de la segunda amplificación. **B.** Carril 1, marcador de peso molecular de acuerdo al panel A Carril 2, control sin retrotranscriptasa, carril 3, control negativo, carril 4, control positivo, carriles 5 a 8 pacientes negativos, carriles 9 a 11, pacientes positivos.



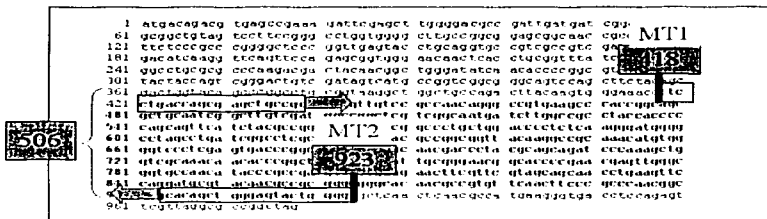


Figura No. 3. Esquema que representa la región que se amplificó del gene codifica para el antígeno  $\alpha$  de *Mycobacterium tuberculosis*. Los iniciadores de secuencia MT1 y MT2 amplifican un fragmento de 506 bp. de acuerdo al número de acceso en el banco de genes de NCBI X98154 g12673860. La amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos.

TESIS CON  
 VALLA DE ORIGEN

1 cccgtgagtt cgaatcaga acgtgggtt ggcggccagg ctgatgtcc tegagccgg  
 21 gaagctc aac gaaatcagaa tacgacatga ccacagactc cggcacaacc ctcagcgaat  
 121 tcttgc aac ttc ggcggagc agacgc aaaa gcaccccatt tcggcaccaa  
 141 atggggg cct gaa gcatgtccg gagaactccag ttc ttggaaa ggtatgggtc  
 181 atgtccagg ttg gtt ggt acccg ccggagctgc gtagcggggt ggttcgggata  
 201 gtc gcagaga tccggggt gggggcctg gtagcggggt cgtaccagtg ggtcccccgt  
 221 ctacttgggt ttggtctgac ggggacggt gctaaatg gggccaggc gcaggtcgal  
 421 gccggccgac ggc cccggat catggtcga gatttccg ct gctgaaggc ctttagcggc  
 481 ggacaacgcc gaat tgcgaa gggcgaacgc gattt aag acccggctgg ctttctcgc  
 541 gcccgagct gcc gccggccag caccgtaant aacggt tcat ccccgatcat caggggcacc  
 601 ggcggggccc cgal ggt ttg cgggggggt g tccagtcgal ctgcacacag ctgaccgagc  
 661 tgggtgtgcc gat gccccc tccacctact acgaccact caaccgggg cccaccgcc  
 721 gcgagctgc cgal ggcgaa ctcaaggag acatcagcc cgtccacgcc gccactacg  
 781 gttttacgg tgcgcgaaa gttggctaa cctgaaccg tgaggggatc gagggtgcc  
 841 gatgcaccgt gaaacggctg atgaccaaac tccgctgtc cgggaccacc cgcggcaag  
 901 ccccgaggac cagatcgtc gatccggcca cagcccctc ccccgatctc gtcacagccc  
 961 gcttcggacc accagacct aaccggctgt gggtagcaga cctcacctat gttcgcact  
 1021 gggcagggtt cgcctacgtg gcc tttgta ccgagcccta cgtccgagga tcttgggtc  
 1081 gcggttcgt tccacgatgg ccacctccat ggtctcga aagccatcg aagccatcg  
 1111 gaccgcgcaa caag aaggcg tactcgacct gaaagcgt ggggggta cggatagggg  
 1201 atctcagtac acat cgalcc ggttcagcca gccctcgc gaccaccctc tccaccctc  
 1261 ggtcggagcg gtcggaaagt ccatgacaa tccactacc gacccatca accggctata  
 1321 caagaccgag ctgatacag gcaaacgc ctggcgctc atcaggatg tccaggtcgc  
 1381 caccgggggc tgggttcgact ggttcaaacca tggggccctc taccagtact gcggggacgt  
 1441 cccggcgctc gaac tggagg ctgtcctaacta cgtctaacgc cagtagaccag cccgcggctg  
 1501 aggtctcaga tccagtagagc tccggactca cggggcggt tccagccctt ggtctcagc  
 1561 gtcagttttg tttgtgcgcg gagggtgggt g tctgggtgt acagagccg tcttgcgggtg

**Figura No. 4.** Esquema que representa la región que se amplificó del gene codifica para la secuencia de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*. Los iniciadores IS5 e IS6 amplifican un fragmento de 989 bp de número de acceso en el banco de genes de NCBI AF39039S1 gi15430108.

TESTEADO  
 EN LA INSTITUCIÓN

25-9

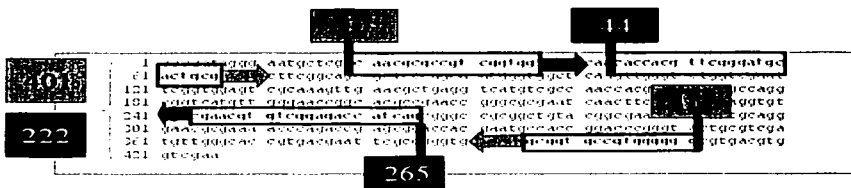
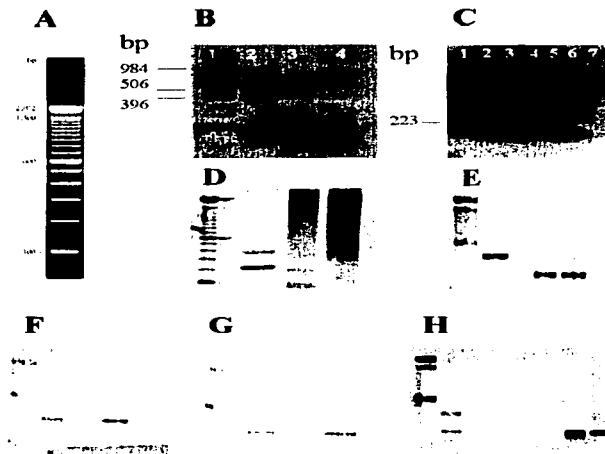


Figura No. 5. Esquema que representa la región que se amplificó del gene codifica para el antígeno mtp40 de *Mycobacterium tuberculosis*. Los iniciadores PT1 y PT2 amplifican un fragmento de 401 bp del antígeno mtp40 (verde), y los iniciadores PT3 y PT4 amplifican un fragmento interno de 222 bp (azul) de acuerdo al número de acceso en el banco de genes de NCBI S69737 gi516582.

TESIS CIOM  
FALLA DE MILLIN



**Figura No. 9. Detección de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en LBA.** Se amplificó DNA mediante PCR de acuerdo al procedimiento descrito en materiales y métodos. Los iniciadores IS5 e IS6 generan un fragmento de 989 bp de la secuencia de inserción IS6110, MT1 y MT2 amplifican un fragmento de 506 bp del antígeno a, PT1 y PT2 amplifican un fragmento de 401 bp del antígeno mtp40, y los iniciadores PT3 y PT4 un fragmento interno de 222 bp del producto de PT1 y PT2, 15 µl de los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PCR múltiple, carriles 1. Marcador de peso molecular; 2, Amplificación utilizando DNA de *M.tuberculosis*; 3, 4, controles negativos. C. PCR anidada. Carril 1, Marcador de peso molecular; 2, 3, 4, DNA de *M.tuberculosis*; 5, 6, 7, controles negativos. D a H pacientes de los grupos 2 y 3 (SIDA y TBP o TBP, respectivamente) después de la PCR anidada D. 1 Marcador de peso molecular, 2. Control positivo, control negativo, 3. GBLs, 4. PPK. F. 1. Marcador de peso molecular, 2. Control positivo, 3. Control negativo 4. PRG. G. 1. Marcador de peso molecular, 2. Control positivo, 3. Control negativo, 4. CDC, H. 1. Marcador de peso molecular, 2. Control positivo, 3. Control negativo, 7. FRS.



.....1	ataactttgt	agggagtgga	aaa	gggggga	gagaactcag	ccctcattcc
21	gotttaaaat	ctctcgggca	ctt	ggactggg	cagttctaga	cagttccgga
101	gtttcaaaag	caacaggtctc	ttc	ctgtctct	acccggggga	ggcagtgcaag
101	caagctgcaaa	gcccccacagt	gaagaaac	ggagctcaga	cccagctaaa	tgccataaagt
241	gaactgcttt	gttaacgcaat	agagctggc	<b>ctgtcttggg</b>	<b>aatctctgtt</b>	<b>gagagccaaa</b>
301	ttcccacagt	atgcaatgaa	tggggaaaa	gacatcaca	acaaatggtg	gaaagccccc
361	tgfcccact	ccagctcagt	gacacaggat	gacctcagt	atcacaacct	cagcaagcag
421	cagaatgagt	ccccccagcc	ccctcgtggg	acgggaaaga	agctccacga	atctctggtc
481	aagctggatg	caaccccat	gtcccccac	cgc	gatcaaaaa	ctggggcagc
541	gggatgactt	tcgaagacac	actccaccat	aac	gatttlaac	ttgcaggtcc
601	aaatctgac	tggggtccat	tatgactccc	aaaagttga	ccagaggacc	cagggacaag
661	ccaccacctc	cagctgggat	tttttttttt	gctctcagat	ttgtcaacca	atattccggc
721	tcttcaaaag	aggcttttat	agggaaacat	ctggccca	gg	ttttctcaggt
781	atgaaacaaa	caggaaacct	ccactcggcg	gttctctcagc	ctactctcgc	caacaaaggag
841	gactggggga	atgcccacag	ctgacttggg	agagctccagt	ggtccaaact	gcaggtcttc
901	gatgcccama	gctgattccac	tcctcgggaa	atggttgcac	aatctctcag	acaagttggt

Figura No. 6. Esquema que representa la región que se amplificó del gene codifica para iNOS humana. Los iniciadores NOS-1 y NOS-2, que corresponden a las posiciones 270 y 757 de acuerdo al banco de genes del NCBI (NM\_153292 gi.24041031), generan un con un producto 488 pb.

TESIS  
FALLA EN ENTREGAR

25-J



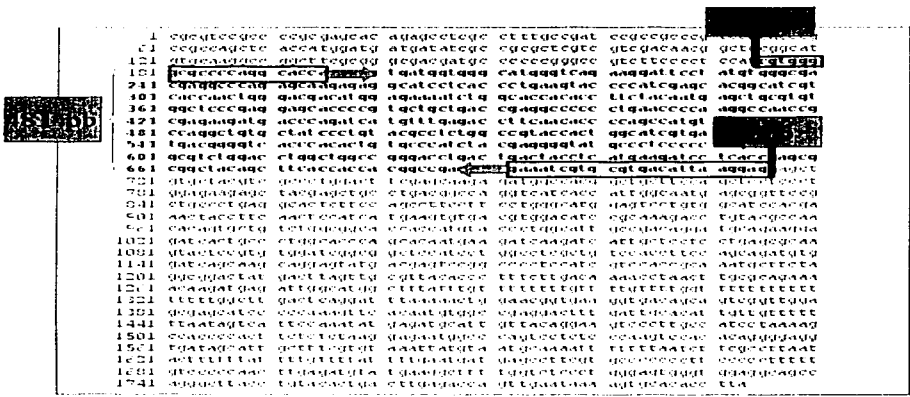


Figura No. 7. Esquema que representa la región que se amplificó del gene codifica para la  $\beta$ -actina humana. Los iniciadores . Los iniciadores BetaAct-1 y BetaAct-2 corresponden a las posiciones 235 y 716, respectivamente, de acuerdo al banco de genes de NCBI (NM\_0011101 gi.5016088) y generan un producto esperado de 481 pb.

TESIS CON  
 BANCOS

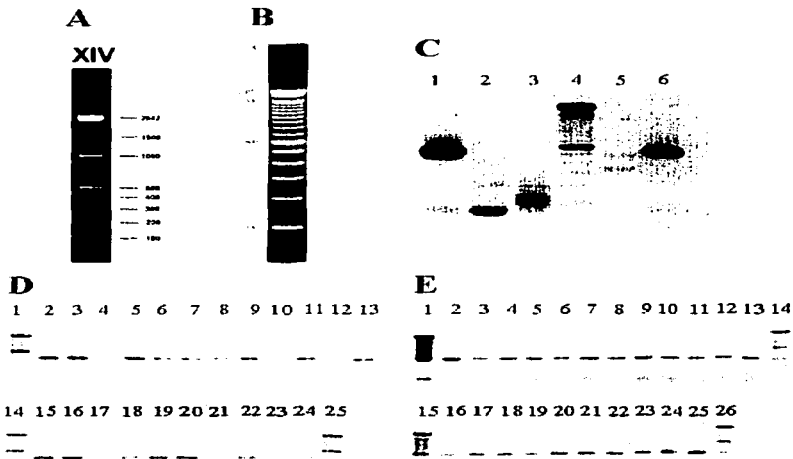
2.5-K

GRUPO	INICIALES	DENSIDAD MAXIMA		RAZON	
		b-ACTINA	iNOS	iNOS/b-actina	
1	SIDA	GCE	232	113	0.5
		BBA	224	195	0.9
		RAAI	242	28	0.1
		SSA	123	146	1.2
		CGV	199	185	0.9
2	SIDA + TBP	GBLS	240	84	0.4
		FCS	239	16	0.1
		PPK	228	70	0.3
3	TBP	PRG	106	10	0.1
		CDC	210	16	0.1
		FRS	224	175	0.8
4	CONTROLES	1	242	160	0.7
		2	251	200	0.8
		3	43	188	4.4
		4	251	201	0.8
		5	186	230	1.2
		6	172	201	1.2
		7	104	257	2.5

**Tabla No. 3. Análisis densitométrico de la amplificación de iNOs y  $\beta$ -actina.** Se realizó análisis densitométrico de los productos de PCR mediante el programa Kodak® Digital Science ID, versión 2.0.2 para Windows®, calculando la razón iNOS/ $\beta$ -actina, de acuerdo a la electroforesis que se presenta en la Figura No. 10

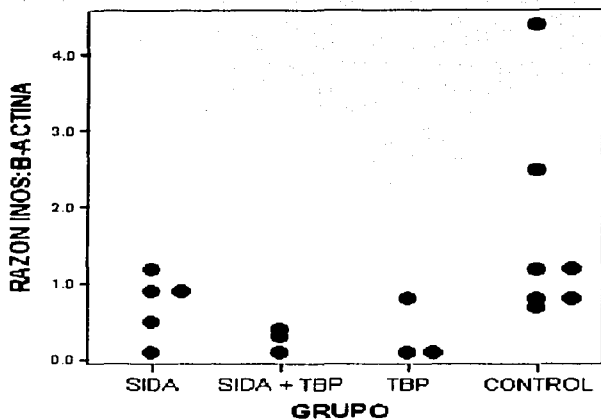
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

250

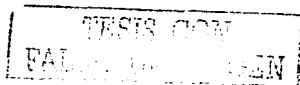


**Figura No. 11. Amplificación del gene de la iNOS en células LBA.**

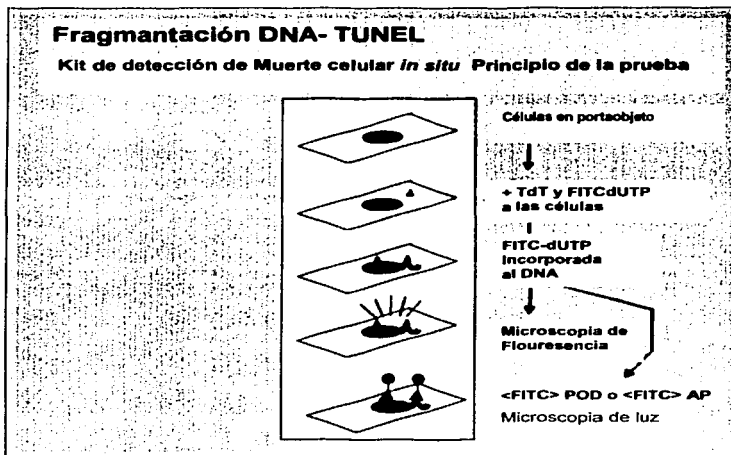
La detección de la iNOS se realizó mediante RT-PCR a partir de células de LBA cultivadas con PMA, como se describe en material y métodos. La expresión de la  $\beta$ -actina fue usada como control de la integridad y cantidad del RNA. Se realizó análisis densitométrico de los productos de PCR mediante el programa Kodak® Digital Science 1D, versión 2.0.2 para Windows®, calculando la razón iNOS/ $\beta$ -actina. **A.** Marcador de peso molecular XIV de Roche, de 100 pb (Cat. No 1 721 933) de acuerdo al catálogo del productor. **B.** Marcador de peso molecular de 100 pb de Invitrogen Life Technologies (Cat. No. 10380-012) de acuerdo al catálogo de productor. **C.** Leucocitos mononucleares de personas sanas, de sangre periférica y estimuladas con PMA. Carril 1, amplificación de la iNOS, Carril 2, Testigo sin retrotranscriptasa. Carril 3, testigo negativo sin estimulación con PMA, en Carril 4, marcadores de peso molecular. Carril 5, testigo de aplicación de  $\beta$ -actina sin retrotranscriptasa, Carril 6, amplificación de  $\beta$ -actina. **D.** Amplificación de iNOS en los sujetos de estudio. Carriles 1, 15 y 25, marcadores de peso molecular. Carriles 2, 3, 15 y 16, testigos positivos, carril 4 testigo negativo. El resto son pacientes. **E.** Amplificación de  $\beta$ -actina. Carriles 1, 14, 15 y 26, el resto son duplicados de las muestras del gel en **D.**



**Figura No. 12. Producción del transcrito de iNOS en los diferentes grupos experimentales.** Se realizó análisis densitométrico de los productos de PCR mediante el programa Kodak® Digital Science ID, versión 2.0.2 para Wndows®, calculando la razón iNOS/β-actina. Datos de acuerdo a la Tabla No. 3. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo una  $P = 0.037$ . La prueba para dos muestras independientes de Kolmogorov-Smirnov comparando el grupo control contra los otros grupos produjo los siguientes resultados: SIDA  $P = 0.683$ , SIDA + TBP  $P = 0.03$ , TBP  $P = 0.308$ .



25-0



**Figura No. 8 .** Diagrama que representa el principio de la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick – End Labeling) para la detección de apoptosis tardía mediante microscopia de fluorescencia.

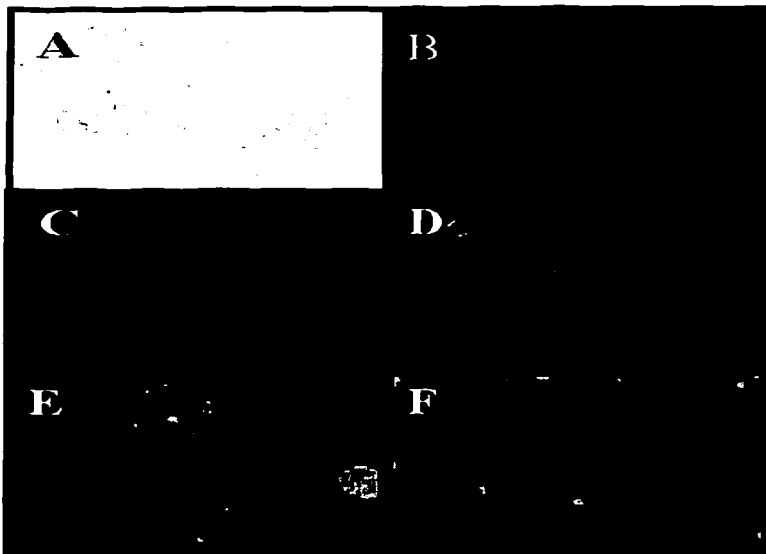
TESIS COM  
FALLA DE  
EN

GRUPO		INICIALES	APOPTOSIS (%)	
			SIN PMA	CON PMA
1	SIDA	GCE	15	18
		BBA	18	12
		RAAI	10	16
		SSA	4	19
		CGV	12	16
		GBLS	7	17
2	SIDA + TBP	PCS	6	3
		PPK	6	6
		PRG	8	16
3	TBP	CDC	7	16
		FRS	6	17
4	CONTROLES	1	2	4
		2	1	6
		3	4	4
		4	2	4
		5	3	5
		6	2	3
		7	5	5

**Tabla No. 4. Proporción de células en apoptosis en los diferentes grupos experimentales.** Las células de LBA se cultivaron con o sin PMA durante 48 h y la proporción de células en apoptosis se determinó por TUNEL de acuerdo a las recomendaciones del productor (Pharmingen) mediante microscopia de fluorescencia (Olympus BX40), de acuerdo a lo descrito en material y métodos.

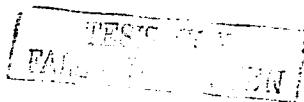
TESIS DE  
FALLA DE INGEN

25-0



**Figura No. 13. Determinación de células en apoptosis.**

Las células de LBA se cultivaron con o sin PMA durante 48 h y la proporción de células en apoptosis se determinó por TUNEL de acuerdo a las recomendaciones del productor (Pharmingen) mediante microscopia de fluorescencia (Olimpus BX40), de acuerdo a lo descrito en material y métodos. **A.** Control normal en luz visible, **B.** Control normal sin activar con PMA, **C.** Control normal inducido con PMA, **D.** Paciente con SIDA sin activar con PMA, **E.** Acercamiento de **F.** Paciente con Tuberculosis y SIDA sin activar con PMA.



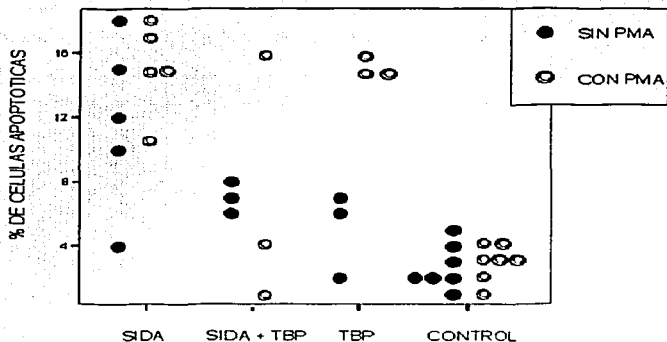
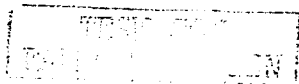


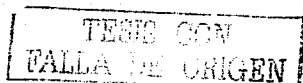
Figura No. 14. Comparación de la proporción de células en apoptosis en los diferentes grupos experimentales, antes y después de estimular con PMA. Datos de acuerdo a la Tabla No. 4. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo una para los grupos sin estimular con PMA  $P = 0.006$  y estimulando con PMA de  $0.015$ . La prueba para dos muestras independientes de Kolmogorov-Smirnov comparando el grupo control contra los otros grupos sin estimular con PMA produjo los siguientes resultados: SIDA  $P = 0.048$ , SIDA + TBP  $P = 0.03$ , TBP  $P = 0.03$ . La misma prueba comparando el grupo control contra los otros grupos después de estimular con PMA dio los siguientes resultados: SIDA  $P = 0.006$ , SIDA + TBP  $P = 0.612$ , TBP  $P = 0.017$ .



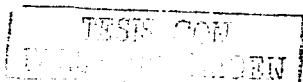


## REFERENCIAS.

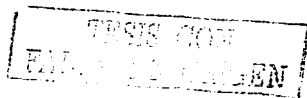
1. Fowler, M. G. and M. F. Rogers. 1996. Overview of perinatal HIV infection. *J.Nutr.* 126:2602S-2607S.
2. MacDougall, D. S. 1999. Global strategies for the prevention of HIV transmission from mothers to infants: the second conference. *J.Int.Assoc.Physicians AIDS Care* 5:52-7, 62.
3. 2000. The Durban Declaration. *Nature* 406:15-16.
4. Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287:607-614.
5. Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397:436-441.
6. McCutchan, F. E., M. O. Salminen, J. K. Carr, and D. S. Burke. 1996. HIV-1 genetic diversity. *AIDS* 10 Suppl 3:S13-S20.
7. Kuwata, T., Y. Miyazaki, T. Igarashi, J. Takehisa, and M. Hayami. 1997. The rapid spread of recombinants during a natural in vitro infection with two human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* 71:7088-7091.
8. Schwartlander, B., G. Garnett, N. Walker, and R. Anderson. 2000. AIDS in a new millennium. *Science* 289:64-66.
9. Kanki, P. J., D. J. Hamel, J. L. Sankale, C. Hsieh, I. Thior, F. Barin, S. A. Woodcock, A. Gueye-Ndiaye, E. Zhang, M. Montano, T. Siby, R. Martink, I. NDoye, M. E. Essex, and S. MBoup. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J.Infect.Dis.* 179:68-73.
10. Alaeus, A., K. Lidman, A. Bjorkman, J. Giesecke, and J. Albert. 1999. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS* 13:901-907.
11. Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu.Rev.Immunol.* 17:657-700.
12. Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature* 381:667-673.



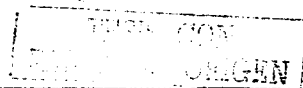
13. Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmor, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-666.
14. Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877.
15. Kostrikis, L. G., Y. Huang, J. P. Moore, S. M. Wolinsky, L. Zhang, Y. Guo, L. Deutsch, J. Phair, A. U. Neumann, and D. D. Ho. 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat. Med.* 4:350-353.
16. Ghorpade, A., M. Q. Xia, B. T. Hyman, Y. Persidsky, A. Nukuna, P. Bock, M. Che, J. Limoges, H. E. Gendelman, and C. R. Mackay. 1998. Role of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 in human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes and microglia. *J. Virol.* 72:3351-3361.
17. Park, I. W., J. F. Wang, and J. E. Groopman. 1999. Expression and utilization of co-receptors in HIV and simian immunodeficiency virus infection of megakaryocytes. *AIDS* 13:2023-2032.
18. Cullen, B. R. 2001. A new entry route for HIV. *Nat. Med.* 7:20-21.
19. Saha, K., J. Zhang, A. Gupta, R. Dave, M. Yimen, and B. Zerhouni. 2001. Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat. Med.* 7:65-72.
20. Saha, K., J. Zhang, and B. Zerhouni. 2001. Evidence of productively infected CD8+ T cells in patients with AIDS: implications for HIV-1 pathogenesis. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 26:199-207.
21. Spira, A. I., P. A. Marx, B. K. Patterson, J. Mahoney, R. A. Koup, S. M. Wolinsky, and D. D. Ho. 1996. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J. Exp. Med.* 183:215-225.
22. Blauvelt, A., S. Glushakova, and L. B. Margolis. 2000. HIV-infected human Langerhans cells transmit infection to human lymphoid tissue ex vivo. *AIDS* 14:647-651.
23. Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duynhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597.



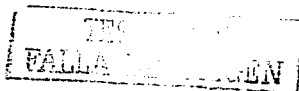
24. Meng, G., M. T. Sellers, M. Mosteller-Barnum, T. S. Rogers, G. M. Shaw, and P. D. Smith. 2000. Lamina propria lymphocytes, not macrophages, express CCR5 and CXCR4 and are the likely target cell for human immunodeficiency virus type 1 in the intestinal mucosa. *J. Infect. Dis.* 182:785-791.
25. Moir, S., A. Malaspina, Y. Li, T. W. Chun, T. Lowe, J. Adelsberger, M. Baseler, L. A. Ehler, S. Liu, R. T. Davey, Jr., J. A. Mican, and A. S. Fauci. 2000. B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J. Exp. Med.* 192:637-646.
26. Spetz, A. L., B. K. Patterson, K. Lore, J. Andersson, and L. Holmgren. 1999. Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *J. Immunol.* 163:736-742.
27. Saifuddin, M., M. L. Hart, H. Gewurz, Y. Zhang, and G. T. Spear. 2000. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 81 Pt 4:949-955.
28. Clerici, M., M. L. Fusi, S. Ruzzante, S. Piconi, M. Biasin, D. Arienti, D. Trabattoni, and M. L. Villa. 1997. Type 1 and type 2 cytokines in HIV infection — a possible role in apoptosis and disease progression. *Ann. Med.* 29:185-188.
29. Herbein, G., U. Mahlknecht, F. Batiwalla, P. Gregersen, T. Pappas, J. Butler, W. A. O'Brien, and E. Verdin. 1998. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* 395:189-194.
30. Dockrell, D. H., A. D. Badley, A. Algeciras-Schimmich, M. Simpson, R. Schut, D. H. Lynch, and C. V. Paya. 1999. Activation-induced CD4+ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4+ T cell count, and HIV plasma viral copy number. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15:1509-1518.
31. Godard, C. M. and J. C. Chermann. 1998. Stimulation of bystander T-cell proliferation by tumor necrosis factor produced by HIV-1-infected macrophages. *J. Hum. Virol.* 1:257-266.
32. Badley, A. D., K. Parato, D. W. Cameron, S. Kravcik, B. N. Phenix, D. Ashby, A. Kumar, D. H. Lynch, J. Tschopp, and J. B. Angel. 1999. Dynamic correlation of apoptosis and immune activation during treatment of HIV infection. *Cell Death. Differ.* 6:420-432.
33. Katsikis, P. D., M. E. Garcia-Ojeda, E. S. Wunderlich, C. A. Smith, H. Yagita, K. Okumura, N. Kayagaki, M. Alderson, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg. 1996. Activation-induced peripheral blood T cell apoptosis is Fas independent in HIV-infected individuals. *Int. Immunol.* 8:1311-1317.



34. Coito, C. and M. Bomsel. 1999. B7 cosignal potentiates apoptosis of uninfected CD4+ T lymphocytic cell lines primed by HIV envelope proteins. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 15:509-521.
35. Lifson, A. R., N. A. Hessel, and G. W. Rutherford. 1992. Progression and clinical outcome of infection due to human immunodeficiency virus. *Clin.Infect.Dis.* 14:966-972.
36. Learmont, J. C., A. F. Geczy, J. Mills, L. J. Ashton, C. H. Raynes-Greenow, R. J. Garsia, W. B. Dyer, L. McIntyre, R. B. Oelrichs, D. I. Rhodes, N. J. Deacon, and J. S. Sullivan. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N.Engl.J.Med* 340:1715-1722.
37. Mendila, M., H. Heiken, S. Becker, M. Stoll, A. Kemper, R. Jacobs, and R. E. Schmidt. 1999. Immunologic and virologic studies in long-term nonprogressors with HIV- 1 infection. *Eur.J.Med Res.* 4:417-424.
38. Buchbinder, S. P., M. H. Katz, N. A. Hessel, P. M. O'Malley, and S. D. Holmberg. 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 8:1123-1128.
39. Pantaleo, G., S. Menzo, M. Vaccarezza, C. Graziosi, O. J. Cohen, J. F. Demarest, D. Montefiori, J. M. Orenstein, C. Fox, L. K. Schragar, and . 1995. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N.Engl.J.Med.* 332:209-216.
40. Volberding, P. A. 1996. Age as a predictor of progression in HIV infection. *Lancet* 347:1569-1570.
41. Bamji, M., D. M. Thea, J. Weedon, K. Krasinski, P. B. Matheson, P. Thomas, G. Lambert, E. J. Abrams, R. Steketee, and M. Heagarty. 1996. Prospective study of human immunodeficiency virus 1-related disease among 512 infants born to infected women in New York City. The New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 15:891-898.
42. Kuhn, L., E. J. Abrams, P. B. Matheson, P. A. Thomas, G. Lambert, M. Bamji, B. Greenberg, R. W. Steketee, and D. M. Thea. 1997. Timing of maternal-infant HIV transmission: associations between intrapartum factors and early polymerase chain reaction results. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS* 11:429-435.
43. Mayaux, M. J., M. Burgard, J. P. Teglas, J. Cottalorda, A. Krivine, F. Simon, J. Puel, C. Tamalet, D. Dormont, B. Masquelier, A. Doussin, C. Rouzioux, and S. Blanche. 1996. Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *JAMA* 275:606-610.

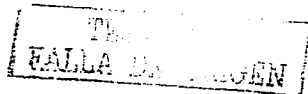


44. Mofenson, L. M., J. Korelitz, W. A. Meyer, III, J. Bethel, K. Rich, S. Pahwa, J. Moye, Jr., R. Nugent, and J. Read. 1997. The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *J. Infect. Dis.* 175:1029-1038.
45. O'Brien, T. R., W. A. Blattner, D. Waters, E. Eyster, M. W. Hilgartner, A. R. Cohen, N. Luban, A. Hatzakis, L. M. Aledort, P. S. Rosenberg, W. J. Miley, B. L. Kroner, and J. J. Goedert. 1996. Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *JAMA* 276:105-110.
46. Srison, D., U. Thisyakorn, S. Paupunwatana, T. Chotpitayasunondh, V. Kanchanamayul, W. Limpitikul, and C. Panpitpat. 1995. Perinatal HIV infections in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 26:659-663.
47. Drut, R., V. Anderson, M. A. Greco, C. Gutierrez, B. Leon-Bojorge, D. Menezes, A. Peruga, G. Quijano, C. Ridaura, M. Siminovich, P. V. Mayoral, and M. Weissenbacher. 1997. Opportunistic infections in pediatric HIV infection: a study of 74 autopsy cases from Latin America. The Latin American AIDS Pathology Study Group. *Pediatr. Pathol. Lab. Med.* 17:569-576.
48. Jean, S. S., G. W. Reed, R. I. Verdier, J. W. Pape, W. D. Johnson, and P. F. Wright. 1997. Clinical manifestations of human immunodeficiency virus infection in Haitian children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16:600-606.
49. Vetter, K. M., G. Djomand, F. Zadi, L. Diaby, K. Brattegaard, M. Timite, J. Andoh, J. A. Adou, and K. M. De Cock. 1996. Clinical spectrum of human immunodeficiency virus disease in children in a west African city. Project RETRO-CI. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15:438-442.
50. Belman, A. L., L. R. Muenz, J. C. Marcus, J. J. Goedert, S. Landesman, A. Rubinstein, S. Goodwin, S. Durako, and A. Willoughby. 1996. Neurologic status of human immunodeficiency virus 1-infected infants and their controls: a prospective study from birth to 2 years. Mothers and Infants Cohort Study. *Pediatrics* 98:1109-1118.
51. Wolters, P. L., P. Brouwers, L. Civitello, and H. A. Moss. 1997. Receptive and expressive language function of children with symptomatic HIV infection and relationship with disease parameters: a longitudinal 24-month follow-up study. *AIDS* 11:1135-1144.
52. Kozlowski, P. B., J. Brudkowska, M. Kraszpulski, E. A. Sersen, M. A. Wrzolek, A. P. Anzil, C. Rao, and H. M. Wisniewski. 1997. Microencephaly in children congenitally infected with human immunodeficiency virus—a gross-anatomical morphometric study. *Acta Neuropathol. (Berl)* 93:136-145.

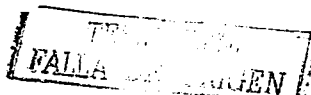


53. Scarmato, V., Y. Frank, A. Rozenstein, D. Lu, R. Hyman, S. Bakshi, S. Pahwa, and S. Pavliakis. 1996. Central brain atrophy in childhood AIDS encephalopathy. *AIDS* 10:1227-1231.
54. Perez RGE, G. R. T. G. 1992. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida en niños. Experiencia de 8 años en el Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza" IMSS. *Bol Med Hosp Infant Mex* 49:581-587.
55. Gelbard, H. A. and L. G. Epstein. 1995. HIV-1 encephalopathy in children. *Curr.Opin.Pediatr.* 7:655-662.
56. Tabatabaie, T., C. Stewart, Q. Pye, Y. Kotake, and R. A. Floyd. 1996. In vivo trapping of nitric oxide in the brain of neonatal rats treated with the HIV-1 envelope protein gp 120: protective effects of alpha-phenyl-tert-butylinitrone. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 221:386-390.
57. Sei, S., S. K. Stewart, M. Farley, B. U. Mueller, J. R. Lane, M. L. Robb, P. Brouwers, and P. A. Pizzo. 1996. Evaluation of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA levels in cerebrospinal fluid and viral resistance to zidovudine in children with HIV encephalopathy. *J. Infect.Dis.* 174:1200-1206.
58. Exhenry, C and D. Nadal. 1996. Vertical human immunodeficiency virus-1 infection: involvement of the central nervous system and treatment. *Eur.J.Pediatr.* 155:839-850.
59. Rajpoot, D., C. J. Kaupke, N. D. Vaziri, T. K. Rao, A. Pomrantz, and S. Fikrig. 1996. Childhood AIDS nephropathy: a 10-year experience. *J.Natl.Med.Assoc.* 88:493-498.
60. Kitchen, B. J., H. D. Engler, V. J. Gill, D. Marshall, S. M. Steinberg, P. A. Pizzo, and B. U. Mueller. 1997. Cytomegalovirus infection in children with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 16:358-363.
61. Nigro, G., A. Krzysztofciak, G. C. Gattinara, T. Mango, M. Mazzocco, M. A. Porcaro, S. Provvedi, and J. C. Booth. 1996. Rapid progression of HIV disease in children with cytomegalovirus DNAemia. *AIDS* 10:1127-1133.
62. Kourtis, A. P., C. Ibegbu, A. J. Nahmias, F. K. Lee, W. S. Clark, M. K. Sawyer, and S. Nesheim. 1996. Early progression of disease in HIV-infected infants with thymus dysfunction. *N.Engl.J.Med.* 335:1431-1436.
63. Marks, M. J., P. J. Haney, M. P. McDermott, C. S. White, and A. D. Vennos. 1996. Thoracic disease in children with AIDS. *Radiographics* 16:1349-1362.
64. Adebajo, A. O. 1997. Rheumatic manifestations of infectious diseases in children. *Curr.Opin.Rheumatol.* 9:68-74.

65. Linnemann de Martinez, D. L., P. G. Lopez, and D. L. Xochihua. 1997. [Allergic diseases and infection with human immunodeficiency virus (HIV)-AIDS in pediatric patients]. *Rev. Alerg. Mex.* 44:55-59.
66. Vall, M. M., A. Maguire, M. Miret, J. Alcaide, I. Parron, and J. Casabona. 1997. The spread of AIDS and the re-emergence of tuberculosis in Catalonia, Spain. *AIDS* 11:499-505.
67. Chan, S. P., J. Birnbaum, M. Rao, and P. Steiner. 1996. Clinical manifestation and outcome of tuberculosis in children with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15:443-447.
68. Mukadi, Y. D., S. Z. Wiktor, I. M. Coulibaly, D. Coulibaly, A. Mbengue, A. M. Folquet, A. Ackah, M. Sassin-Morokro, D. Bonnard, C. Maurice, C. Nolan, J. K. Kreiss, and A. E. Greenberg. 1997. Impact of HIV infection on the development, clinical presentation, and outcome of tuberculosis among children in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS* 11:1151-1158.
69. Rieder, H. L., J. M. Watson, M. C. Raviglione, M. Forssbohm, G. B. Migliori, V. Schwobel, A. G. Leitch, and J. P. Zellweger. 1996. Surveillance of tuberculosis in Europe. Working Group of the World Health Organization (WHO) and the European Region of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) for uniform reporting on tuberculosis cases. *Eur. Respir. J.* 9:1097-1104.
70. Raviglione, M. C., D. E. Snider, Jr., and A. Kochi. 1995. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 273:220-226.
71. Balcewicz-Sablinska, M. K., J. Keane, H. Kornfeld, and H. G. Remold. 1998. Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- alpha. *J. Immunol.* 161:2636-2641.
72. Lin, Y., M. Zhang, F. M. Hofman, J. Gong, and P. F. Barnes. 1996. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 64:1351-1356.
73. Espinal, M. A., E. N. Perez, J. Baez, L. Henriquez, K. Fernandez, M. Lopez, P. Olivo, and A. L. Reingold. 2000. Infectiousness of Mycobacterium tuberculosis in HIV-1-infected patients with tuberculosis: a prospective study. *Lancet* 355:275-280.
74. Zhang, M., J. Gong, D. V. Iyer, B. E. Jones, R. L. Modlin, and P. F. Barnes. 1994. T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Invest* 94:2435-2442.

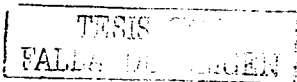


75. Havlir, D. V. and P. F. Barnes. 1999. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N.Engl.J.Med.* 340:367-373.
76. De Cock, K. M., B. Soro, I. M. Coulibaly, and S. B. Lucas. 1992. Tuberculosis and HIV infection in sub-Saharan Africa. *JAMA* 268:1581-1587.
77. Selwyn, P. A., D. Hartel, V. A. Lewis, E. E. Schoenbaum, S. H. Vermund, R. S. Klein, A. T. Walker, and G. H. Friedland. 1989. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N.Engl.J.Med.* 320:545-550.
78. Braun, M. M., N. Badi, R. W. Ryder, E. Baende, Y. Mukadi, M. Nsuami, B. Matela, J. C. Willame, M. Kaboto, and W. Heyward. 1991. A retrospective cohort study of the risk of tuberculosis among women of childbearing age with HIV infection in Zaire. *Am.Rev.Respir.Dis.* 143:501-504.
79. Antonucci, G., E. Girardi, M. C. Raviglione, and G. Ippolito. 1995. Risk factors for tuberculosis in HIV-infected persons. A prospective cohort study. The Gruppo Italiano di Studio Tubercolosi e AIDS (GISTA). *JAMA* 274:143-148.
80. Di Perri, G., M. Cruciani, M. C. Danzi, R. Luzzati, G. De Checchi, M. Malena, S. Pizzighella, R. Mazzi, M. Solbiati, E. Concia, and . 1989. Nosocomial epidemic of active tuberculosis among HIV-infected patients. *Lancet* 2:1502-1504.
81. Daley, C. L., P. M. Small, G. F. Schecter, G. K. Schoolnik, R. A. McAdam, W. R. Jacobs, Jr., and P. C. Hopewell. 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N.Engl.J.Med.* 326:231-235.
82. Eisenach, K. D., M. D. Sifford, M. D. Cave, J. H. Bates, and J. T. Crawford. 1991. Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am.Rev.Respir.Dis.* 144:1160-1163.
83. Wyllie, A. H., J. F. Kerr, and A. R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* 68:251-306.
84. Antoni, B. A., P. Sabbatini, A. B. Rabson, and E. White. 1995. Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection. *J. Virol.* 69:2384-2392.
85. Koppenol, W. H. and J. G. Traynham. 1996. Say NO to nitric oxide: nomenclature for nitrogen- and oxygen- containing compounds. *Methods Enzymol.* 268:3-7.
86. Knowles, R. G. and S. Moncada. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem.J.* 298 ( Pt 2):249-258.





87. Vera, M. L., M. L. Cardenas, and H. Niemeyer. 1984. Kinetic, chromatographic and electrophoretic studies on glucose- phosphorylating enzymes of rat intestinal mucosa. *Arch.Biochem.Biophys.* 229:237-245.
88. Nathan, C. and Q. W. Xie. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J.Biol.Chem.* 269:13725-13728.
89. Sanduzzi, A., M. Fraziano, and F. Mariani. 2001. Monocytes/macrophages in HIV infection and tuberculosis. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents* 15:294-298.
90. Bocchino, M., A. Sanduzzi, and F. Bariffi. 2000. Mycobacterium tuberculosis and HIV co-infection in the lung: synergic immune dysregulation leading to disease progression. *Monaldi Arch.Chest Dis.* 55:381-388.
91. Hertoghe, T., A. Wajja, L. Ntambi, A. Okwera, M. A. Aziz, C. Hirsch, J. Johnson, Z. Toossi, R. Mugerwa, P. Mugenyi, R. Colebunders, J. Ellner, and G. Vanham. 2000. T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB). *Clin.Exp.Immunol.* 122:350-357.
92. Law, K. F., J. Jagirdar, M. D. Weiden, M. Bockin, and W. N. Rom. 1996. Tuberculosis in HIV-positive patients: cellular response and immune activation in the lung. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 153:1377-1384.
93. Mayanja-Kizza, H., J. L. Johnson, C. S. Hirsch, P. Peters, K. Surewicz, M. Wu, G. Nalugwa, F. Mubiru, H. Luzze, A. Wajja, H. Aung, J. J. Ellner, C. Whalen, and Z. Toossi. 2001. Macrophage-activating cytokines in human immunodeficiency virus type 1-infected and -uninfected patients with pulmonary tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 183:1805-1809.
94. Placido, R., G. Mancino, A. Amendola, F. Mariani, S. Vendetti, M. Piacentini, A. Sanduzzi, M. L. Bocchino, M. Zembala, and V. Colizzi. 1997. Apoptosis of human monocytes/macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection. *J.Pathol.* 181:31-38.
95. Vanham, G., Z. Toossi, C. S. Hirsch, R. S. Wallis, S. K. Schwander, E. A. Rich, and J. J. Ellner. 1997. Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy. *Tuber.Lung Dis.* 78:145-158.
96. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S. A. Ben Sasson. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation 1. *J.Cell Biol.* 119:493-501.
97. Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15:532-537.



98. Miralles, G. D., M. Y. Stoeckle, D. F. McDermott, F. D. Finkelman, and H. W. Murray. 1994. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect.Immun.* 62:1058-1063.
99. Sugaya, H., M. Aoki, T. Abe, K. Ishida, and K. Yoshimura. 1997. Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol.Res.* 83:10-15.
100. 1987. Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep.* 36:225-226.
101. 1992. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep.* 41:1-19.
102. Mariani, F., D. Goletti, A. Ciaramella, A. Martino, V. Colizzi, and M. Fraziano. 2001. Macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* during HIV infection: relationships between macrophage activation and apoptosis. *Curr.Mol.Med* 1:209-216.

