

8



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UNAM
POSGRADO



DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS

*ESTUDIO DE LAS CAUSAS DE LA DISMINUCION EN
LA SECRECION DE IL-2 EN LINFOCITOS T
HUMANOS CAUSADA POR ARSENICO*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A:
BIOL. GEORGINA ANTIGONA GALICIA ROSAS

ASESOR: DR. RAFAEL S. SAAVEDRA DURAN



MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. PMDCB/311/2001

BIÓL. GEORGINA ANTÍGONA GALICIA ROSAS
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

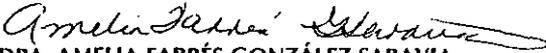
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 7 de mayo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Estudio de las causas de la disminución en la secreción de IL-2 en linfocitos T humanos causada por arsénico", dirigida por el Dr. Rafael Saavedra Durán.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
VOCAL	Dr. Fernando García Tamayo
SECRETARIO	Dr. Enrique Ortega Soto
SUPLENTE	Dra. Herminia Loza Tavera
SUPLENTE	Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de mayo del 2001.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA


DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*lgg.



Nosotros, anatomistas, no hacemos más que interpretar la Obra y, en la medida en que conseguimos iluminar allí donde antes había sombras, no hacemos otra cosa que adorar al Creador. La ciencia, tal como yo la concibo, es el medio para entender y entonces adorar Su creación. Mis modestísimas máquinas no son más que torpes remedos comparadas con la Obra del Altísimo y no tienen otro propósito que el de hacer comprensible, al menos, una breve parte de la Creación.

Mateo Colón (El Anatomista)

Federico Andahazi

Agradezco a los H. Miembros del jurado por sus valiosos comentarios y críticas al presente trabajo

Agradezco especialmente:

Al Dr. Rafael Saavedra Durán por haberme apoyado en la realización de este trabajo, por sus enseñanzas, por brindarme su amistad y su confianza.

A la Dra. Patricia Ostrosky por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por sus valiosos comentarios, su amistad y su apoyo.

Agradezco a la M. en IBB. Delia del Rosario Leyva Meza por el apoyo técnico que me brindó para la realización de este trabajo.

*A mi Mamá por su apoyo incondicional,
paciencia, cariño y confianza sin lo cual no
hubiera logrado llegar a esta meta*

A mi Papá por ser una de sus consentidas

A mi hermana por sus consejos y motivación

A mi Mamá Chayo por sus palabras de aliento y coraje para vivir

A todos mis primos, sobrinos y tíos que se interesan siempre en mis experimentos.

A María Luisa, Gaby, Erika y Jeny Solange por ser siempre mis amigas y soportarme.

*A mis amigos y compañeros: Eda, Paty, Erika Segura, Horacio, Agustín, José Luis,
Mariana, Germán, Hugo (por los tres litros de sangre), Silvia, Ileana, Carmen, Octavio,
Irma por hacerme agradable y divertido el trabajo en el laboratorio.*

*A Matías, por las distancias acortadas, por los buenos y los malos ratos que hemos pasado
juntos y los que faltan.*

GLOSARIO

CKII	Caseína cinasa II
Con A	Concanavalina A
DAG	Diacylglicerol
DMA	Ácido dimetilarsínico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GDP	Guanosina 5'difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GSH	Glutación
GTP	Guanosina 5'trifosfato
hsp	Proteínas de choque térmico
IL-2	Interleucina 2
IP ₃	Inositol trifosfato
ITAM	Inmunorreceptor con motivos de activación basados en tirosina
MAP	Mitogen activated protein kinase (proteína cinasa activada por mitógeno)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MMA	Ácido monometilarsónico
NaAsO ₂	Arsenito de sodio
NF-κB	Factor nuclear-κB
NF-AT	Factor nuclear de activación en células T
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PHA	Fitohemaglutinina
PKC	Proteína cinasa C
PWM	Mitógeno Pokewed
RIL-2	Receptor de IL-2
SAM	S-adenosilmetionina
SCEs	Intercambio de cromátidas hermanas
TCR	Receptor de la célula T

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Metales	1
I.2 Arsénico	1
I.2.1 Propiedades fisicoquímicas	1
I.2.2 Metabolismo	2
I.2.3 Vías de exposición	3
I.2.4 Toxicidad	4
I.2.5 Efectos Carcinogénicos	5
I.2.6 Mecanismo de acción	5
I.2.6.1 DNA	5
I.2.6.2 Proliferación celular	7
I.2.6.3 Proteínas	7
I.2.7. Efectos en el sistema inmune	8
I.3 Activación del linfocito T	9
I.3.1 CD4 y CD8	12
I.3.2 CD69	13
I.3.3 Interleucina 2	14
I.3.4 Receptor de IL-2	17
II. HIPÓTESIS	20
III. OBJETIVOS	20
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	21
IV.1 Soluciones para cultivo de células	21
IV.1.1 Medios de cultivo	21
IV.1.2 Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS)	21
IV.1.3 NaAsO ₂	21
IV.2 Cultivo de células mononucleares de sangre periférica	
IV.2.1 Donadores de sangre	22
IV.2.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	22
IV.2.3 Ensayo de proliferación: incorporación de [³ H]-timidina	22
IV.2.4 Ensayo de proliferación: obtención de sobrenadantes y citometría de flujo ..	22
IV.3 Determinación de IL-2	23
IV.3.1 Cultivo de células CTLL-2	23

IV.3.2 Cuantificación de IL-2 por bioensayo	23
IV.4 Citofluorometría	24
IV.4.1 Citofluorómetro (FACS)	24
IV.4.2 Reactivos	24
IV.4.3 Anticuerpos usados	24
IV.4.4 Diacetato de 5'6-carboxifluoresceína, succinimidil ester (CFSE)	25
IV.4.5 Solución de lavado y marcado para inmunofluorescencia	25
IV.4.6 Solución de marcado para ciclo celular	25
IV.5 Determinación de la división celular con CFSE	25
IV.5.1 Tinción con CFSE	25
IV.5.2 Determinación de la división celular por citofluorometría con CFSE	25
IV.6 Inmunofluorescencia directa	26
IV.7 Inmunofluorescencia indirecta	26
IV.8 Determinación de IL-2 intracelular	27
IV.9 Determinación de viabilidad	27
IV.10 Ciclo celular	27
V. RESULTADOS	29
V.1 Efecto del arsenito de sodio en la proliferación de los linfocitos T	29
V.2 Determinación de la proliferación por tinción con CFSE	33
V.3 Determinación de la viabilidad por citometría de flujo	35
V.4 Determinación de marcadores de activación temprana	38
V.5 Determinación de la expresión de marcadores celulares CD3, CD4 y CD8	40
V.6 Determinación de IL-2 intracelular por citometría de flujo	43
V.7 El arsénico no impide el pegado de los anticuerpos al CD3 y a la IL-2	46
V.8 Cuantificación de IL-2 en los sobrenadantes	48
V.9 Ciclo Celular	50
VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	53
VII. REFERENCIAS	59

I. INTRODUCCIÓN

I.1 METALES

Los metales y metaloides representan un grupo importante de contaminantes ambientales, no sólo por su amplia distribución en la naturaleza, sino también porque la actividad tecnológica del hombre ha incrementado su emisión en los últimos años, por lo que las exposiciones humanas ocupacionales, ambientales o accidentales se presentan con mayor frecuencia. Se conocen bien los efectos inmediatos en la salud, sin embargo los efectos a largo plazo son menos conocidos. Se sabe que algunos metales pueden afectar adversamente la respuesta inmune, alterando la resistencia del individuo a agentes infecciosos y al desarrollo de tumores, así como provocando enfermedades autoinmunes (Bigazzi, 1999; Vega, 1998). Dentro de este grupo de contaminantes ambientales, el arsénico es uno de los compuestos tóxicos de mayor importancia pues está identificado como carcinógeno para el hombre y está ampliamente distribuido en la corteza terrestre con una abundancia relativa de 2 a 5 ppm (IARC, 1987).

I.2 ARSÉNICO

I.2.1 Propiedades físicoquímicas

El arsénico está clasificado como un metaloide, aunque tiene muchas de las propiedades de los metales pesados. Pertenece al grupo VA de la tabla periódica, su número atómico es 33 y su peso atómico 74.9. En la naturaleza se encuentra en los estados de oxidación -3, +3 y +5; en el estado -3 el compuesto más importante es la arsina (AsH_3). En los estados +3 y +5 el arsénico forma fundamentalmente arsenitos (As^{3+}) y arsenatos (As^{5+}), siendo los arsenitos las formas más tóxicas del arsénico.

En la naturaleza el arsénico está presente principalmente en forma As^{5+} . El As^{3+} se encuentra en donde prevalecen las condiciones reductoras, tales como en depósitos profundos de agua. El agua de bebida usualmente contiene algunos microgramos de arsénico por litro, pero en algunas regiones donde el agua está en contacto con rocas que son ricas en minerales que contienen arsénico se puede llegar a tener más de 1 mg/L (Mäki-Paakkanen et al., 1998).

De manera natural el arsénico se encuentra formando alrededor de 150 diferentes minerales, y es liberado al ambiente como resultado de la actividad volcánica y la erosión de los depósitos minerales. Las principales actividades humanas responsables de la emisión de arsénico al

medio son: la generación de energía eléctrica, procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos, el uso de combustibles fósiles, el uso del arsénico como barniz en dispositivos sólidos como los transistores, y el arsenuro de galio como un material láser para convertir la electricidad en luz coherente (semiconductores). El arsénico inorgánico está presente en pesticidas, raticidas y herbicidas (Harrison y McCoy, 2001). Por otra parte, el arsénico tiene una larga historia de uso en la medicina como antibiótico. Recientemente, ha ganado interés en el tratamiento del cáncer, especialmente en leucemias (Chen, 1997).

1.2.2 Metabolismo

En forma soluble el arsénico es eficientemente absorbido en el tracto gastrointestinal (70-90%) y distribuido a otros órganos. Cerca del 50-60% del arsénico ingerido es excretado en la primera semana después de su ingestión. La mayoría de los mamíferos metabolizan el arsénico inorgánico a ácido monometilarsónico (MMA) y ácido dimetilarsínico (DMA). Se cree que la metilación ocurre por una reducción del As^{5+} a As^{3+} y la adición de un grupo metilo (Fig 1). Los tioles, en particular el glutatión (GSH), juegan un papel muy importante en la reducción del As^{5+} a As^{3+} . La vía principal de metilación en el organismo requiere de metionina, en su forma activada de S-adenosilmetionina (SAM), que actúa como cofactor, y el GSH reducido, que actúa como donador de electrones para la reducción de los compuestos arsenicales. El grupo metilo es transferido de la SAM al arsénico en su estado trivalente de oxidación por medio de metil transferasas. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la actividad metiladora se localiza en el citosol de las células hepáticas y que la vitamina B12 (cianocobalamina), coenzima B12 (5'-deoxiadenosil-cobalamina) y metil B12 (metilcobalamina) pueden actuar como donadores de grupos metilo previos a SAM (Healy et al., 1998; Styblo y Thomas, 1997; Vahter, 2000).

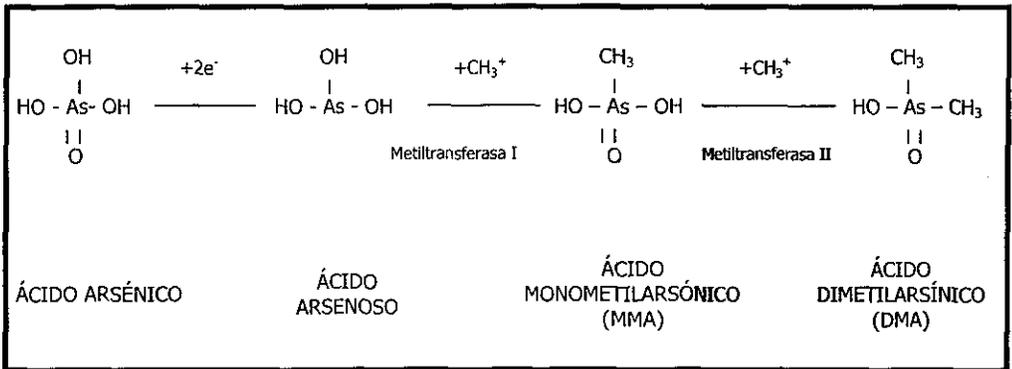


Figura 1. Metabolismo del arsénico inorgánico en mamíferos (Yamaka y Okada 1994).

Estudios experimentales han mostrado que una fracción importante del As^{5+} es rápidamente reducida a As^{3+} en la sangre. Sin embargo, el arsénico ingerido por vía oral es metilado principalmente en la fracción citosólica del hígado, aunque la metilación puede llevarse a cabo en diferentes órganos como el cerebro, el pulmón, el intestino y el riñón (Mass y Wang, 1997).

En el hombre los principales productos excretados encontrados en orina son: el arsénico inorgánico, el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA) en proporciones de 10-20, 10-15 y 60-80%, respectivamente. Recientemente, fue identificada una población con una baja excreción de MMA, lo cual sugiere que puede existir un polimorfismo en la metilación del As. Sin embargo, estas diferencias en la excreción de las formas metiladas del As también dependen del estilo de vida y la alimentación de los individuos expuestos (Vahter, 2000).

Por otro lado se sabe que los compuestos metilados del arsénico no se desmetilan para formar arsénico inorgánico (Salazar, 1998). El proceso de metilación del arsénico fue sugerido como la vía principal de detoxificación en los mamíferos. Por otra parte Bogdan y cols. (1994) sugieren que la unión del arsenito a las proteínas puede ser una ruta primaria de detoxificación en los mamíferos, así como la unión del As^{3+} a ditioles presentes en moléculas que presentan grupos tioles vecinales (glutatión, 2,3-dimercaptopropanol, etc.) (Stybło y Thomas, 1997).

1.2.3 Vías de exposición

Una de las vías de exposición al arsénico es la ingestión de alimentos de origen marino, entre las cuales los peces y los crustáceos presentan los niveles más altos de arsénico; sin embargo, la ingestión de agua proveniente de subsuelos ricos en depósitos minerales que contienen arsénico es la fuente más significativa de exposición tóxica y constituye un problema de salud pública descrito en diversas áreas geográficas del mundo (Taiwán, Argentina, Chile, India, Estados Unidos y México) (Hsu et al., 1997), ya que millones de personas están expuestas de forma crónica al arsénico inorgánico (Harrison y McCoy, 2001). En estas regiones se excede la concentración de $10 \mu\text{g/L}$ de As en el agua, que es la norma permitida por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1993).

México es uno de los principales países en la producción de arsénico y existen zonas en los estados de Puebla, Chihuahua, Hidalgo, Morelos, Nuevo León, Coahuila y Durango, con agua contaminada, donde el problema de hidroarsenicismo crónico en los habitantes de estas regiones es preocupante (Salazar, 1998).

I.2.4 Toxicidad

Las sales solubles de arsénico inorgánico son altamente tóxicas. La dosis letal de trióxido de arsénico ingerido es de 1-3 mg/kg en humanos (WHO, 1981). Los síntomas de intoxicación por arsénico incluyen náuseas, dolor de cabeza, dolor abdominal severo debido al daño en la mucosa gastrointestinal, vómito y diarrea causadas por parálisis del control capilar en el tracto intestinal (Dock y Vahter, 1998). Eventualmente el epitelio gastrointestinal puede desprenderse, seguido por la disminución del volumen de sangre, baja de presión, alteración del funcionamiento del corazón, falla del sistema cardiovascular, falla de las funciones del cerebro y muerte. Intoxicaciones agudas no fatales pueden resultar en daño al sistema nervioso periférico, manifestándose como pérdida sensorial debida a una degeneración axonal, anemia y leucopenia, fiebre, anorexia, hepatomegalia y melanosis. Por otra parte, la inhalación de arsénico afecta el tracto respiratorio causando rinitis, laringitis y bronquitis. En altos niveles de exposición han sido reportados hiperplasia y atrofia en el tracto respiratorio y perforación del septo nasal (Dock y Vahter, 1998).

Exposiciones subcrónicas y crónicas a arsénico inorgánico han sido asociadas con la reducción de la velocidad de conducción nerviosa y daño hepático. Se ha observado daño en el sistema vascular periférico en personas expuestas a arsénico en agua de bebida (Jha et al., 1992; Li y Chou, 1992). Este daño vascular puede provocar gangrena de las extremidades inferiores, conocida como enfermedad del pie negro. La ingestión de arsénico también provoca alteraciones en la pigmentación de la piel; áreas de hiper- o hipopigmentación son frecuentemente vistas en el cuello, pecho y espalda. Otras áreas son la palmoplantar y papular y éstas eventualmente pueden desarrollarse en lesiones malignas (Hsu et al., 1997; Menzel et al., 1999; Simeonova et al., 2000).

La arsina (AsH_3) es otra forma altamente tóxica del arsénico; causa anemia hemolítica severa seguida por falla renal aguda. La toxicidad es observada en exposiciones menores a 10 ppm. La hemólisis ocurre después de la fijación de la arsina en forma no volátil por la hemoglobina (Dock y Vahter, 1998).

El mecanismo más importante que se postula para explicar la toxicidad de los compuestos de arsénico trivalentes es por su afinidad a los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Las enzimas son particularmente afectadas si el grupo tiol está ubicado en el sitio activo o en un sitio crítico para su actividad (Menzel et al., 1999) o para su estabilidad estructural. Por otro lado, el arsénico pentavalente puede sustituir al grupo fosfato en reacciones catalizadas enzimáticamente, afectando procesos como la producción de ATP y síntesis de ADN (Hu et al., 1998; Voet y Voet, 1992). Sin embargo, es difícil evaluar su contribución tóxica debido a la reducción del As^{5+} a As^{3+} en el

organismo.

1.2.5 Efectos carcinogénicos

Los efectos tóxicos agudos del arsénico se manifiestan en los sistemas respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular, nervioso y hematopoyético. Sin embargo, en poblaciones expuestas crónicamente a dosis no letales de arsénico se ha encontrado una mayor incidencia de enfermedades como hiperqueratosis, pie negro, cáncer de piel, pulmón, vejiga, hígado, de tracto gastrointestinal, de cavidad nasal y de riñón (Ramírez et al., 1997)

Un incremento en la incidencia de cáncer en gente expuesta a arsénico fue observada desde principios del siglo XIX. Inicialmente se observó un incremento en la incidencia de cáncer de pulmón en trabajadores de fundidoras y en mineros, continuando con reportes de incidencia elevada de cáncer en pacientes usando medicinas con arsénico. La asociación entre la ingestión de arsénico y el desarrollo de cáncer de piel ha sido confirmada por estudios en áreas donde el agua de bebida contiene altas concentraciones de arsénico (Mäki-Paakkanen et al., 1998). Varias formas de cáncer de piel relacionadas con la ingestión de arsénico han sido descritas, incluyendo carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas. Recientemente se ha observado un incremento de mortalidad por cáncer de órganos internos (hígado, pulmón, riñón y vejiga) en poblaciones expuestas a arsénico (Dock y Vahter, 1998; Mäki-Paakkanen et al., 1998).

Aunque los estudios epidemiológicos consideran que el arsénico es un agente carcinogénico para los humanos, no se ha encontrado que los compuestos arsenicales puedan producir cáncer en los modelos animales y no existe una clara explicación para esta diferencia de toxicidad entre los humanos y los modelos animales (Menzel et al., 1999).

1.2.6 Mecanismo de acción

1.2.6.1 DNA

A nivel celular el arsénico inhibe la reparación del daño inducido por la radiación ultravioleta o por el metilmetanosulfonato. Recientemente, varios estudios apoyan la alteración de los mecanismos de reparación inducida por el arsénico (Jha et al., 1992). En esta dirección se ha propuesto que el arsénico inhibe el reensamble de las cadenas rotas de DNA al interactuar con los grupos ditioles de las enzimas de reparación. Además, se ha evaluado la reparación por excisión de nucleótidos en fibroblastos tratados con arsenito después de una radiación con rayos UV,

encontrándose alteradas la unión de los fragmentos del DNA y la transcripción acoplada a reparación (Jha et al., 1992; Snyder, 1989). También existe evidencia de que los compuestos de arsénico pueden interferir en los procesos de reparación del DNA, incluyendo la inhibición de la remoción de dímeros de pirimidina en células humanas SF34 después de irradiarlas con luz UV, el bloqueo de la reparación del DNA dañado por rayos X y luz UV, inhibición de la reparación post-replicación del daño inducido por luz UV y la inhibición de la actividad de la DNA ligasa II de mamíferos (Li y Rossman, 1989).

El arsénico induce aberraciones cromosómicas (estructurales y numéricas) y micronúcleos (Ostrosky et al., 1991; Gonsebatt et al., 1992; Vega et al., 1995). La ingestión de agua con arsénico incrementa el intercambio de cromátidas hermanas (SCEs) en linfocitos de sangre periférica, así como en linfocitos tratados con As^{3+} *in vitro* (Hsu et al., 1997). Se ha demostrado que los compuestos de arsénico trivalentes son más efectivos en la inducción de aberraciones cromosómicas que los compuestos pentavalentes de arsénico, mientras que los SCEs son inducidos a dosis más bajas de arsénico de las que son requeridas para inducir aberraciones cromosómicas. El mecanismo propuesto por el cual el arsénico induce efectos en los cromosomas es mediado por los efectos del arsénico en las enzimas de reparación del DNA (Rasmussen y Menzel., 1997). Sin embargo, se ha reportado que el arsenito induce proteínas asociadas a los rompimientos de cadenas de DNA (Vega, 1998), lo cual podría explicar las aberraciones inducidas y los SCEs.

En cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio se ha demostrado el efecto aneugénico debido a la alteración de la estructura del citoesqueleto (Ramírez et al., 1997; Vega et al., 1995).

Se ha demostrado que los compuestos de arsénico inducen amplificación de genes y alteraciones en la expresión de genes en células de mamífero (Corsini et al., 1999; Hu et al., 1998; Mass y Wang, 1997; Roussel y Barchowsky, 2000). El arsenato y arsenito de sodio son potentes incrementadores de la amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa en células de ratón 3T3 (Lee et al., 1988); el mismo gen es amplificado en queratinocitos humanos transformados por el virus SV40 (Rossman, 1992). El $NaAsO_2$ induce la expresión de genes de proteínas de respuesta a estrés (hsps) que incluyen: a) ubiquitina, la cual está involucrada en la degradación de proteínas por el proteosoma; b) hps 90 asociada con la transducción de señales (Deaton et al., 1990); c) hsp 70, proteínas asociadas con la traslocación de proteínas a través de las membranas (Deaton et al., 1990; Hu et al., 1998; Ohtsuka et al., 1990); d) también incrementa la expresión del gen de resistencia múltiple a drogas (MDRI); e) el gen de hemooxigenasa (Hu et al., 1998; Keyse et al., 1990) y de oncogenes y factores de crecimiento como *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, así como el TGF- α .

(transforming growth factor α). También modula la cascada de MAP cinasas, que da como resultado la activación de factores de transcripción como AP-1, el cual es un importante regulador del crecimiento celular (Germolec et al., 1996; Simeonova et al., 2000; Roussel y Barchowsky, 2000). Por otra parte se ha demostrado que el As^{3+} modifica la actividad del factor transcripción- κB NF- κB (Corsini, 1999; Roussel y Barchowsky, 2000).

1.2.6.2 Proliferación celular.

Se ha descrito que la cinética de proliferación de los linfocitos de individuos que consumen As en el agua de bebida está disminuida, pues es evidente un retraso en la progresión del ciclo celular (Ostrosky et al., 1991). Resultados similares se han reportado al tratar con As *in vitro* linfocitos provenientes de personas no expuestas crónicamente a As por agua de bebida (Gonsebatt et al., 1994; Ostrosky et al., 1991). Por otra parte, se ha demostrado que el $NaAsO_2$ provoca la activación o inactivación de p53 y otros oncogenes que controlan la proliferación celular (Salazar et al., 1997).

1.2.6.3 Proteínas

El arsenito es un efectivo inductor de proteínas de choque térmico (hsp) como son las de 70 kDa a los 90 kDa y que se sabe tienen importantes funciones en las células. Las proteínas de choque térmico de 70 kDa están asociadas con la translocación y secreción de algunas proteínas así como al proceso de importación de proteínas mitocondriales, mientras que las proteínas de choque térmico de 90 kDa están identificadas como proteínas unidas a receptores de glucocorticoides entre otros. Cada proteína alterada por el arsenito puede tener cierta función intracelular y los cambios en los niveles de estas proteínas podrían afectar diferentes funciones celulares (Aoki et al., 1990).

El arsénico incrementa el estado de fosforilación de las proteínas celulares causando hiperfosforilación de las proteínas de respuesta a estrés y disminuyendo la fosforilación de otras.

Otra proteína afectada por el arsénico es la piruvato deshidrogenasa, por interacción del arsenito con el grupo sulfhidrilo del ácido lipoico (Farrel y Costa, 1997; Hu et al., 1998). La toxicidad del arsenito parece ser el resultado de la afinidad de éste por los grupos sulfhidrilo. Algunas proteínas y enzimas son alteradas por la exposición a arsenito. Por otro lado el arsénico afecta a las enzimas mitocondriales y altera la respiración, lo cual es relevante en la toxicidad celular (Farrel y Costa, 1997; Li y Chou, 1992). Las proteínas del citoesqueleto contienen una gran cantidad de residuos de cisteína y ciertos grupos -SH de la tubulina son cruciales para la polimerización de esta proteína, por lo que el citoesqueleto es un blanco importante para el daño por As^{3+} (Li y Chou,

1992). El arsénico inorgánico se une a grupos -SH y la unión es más fuerte con grupos -SH vecinos, por ejemplo en la queratina del pelo, uñas y piel, por lo que estos tejidos generalmente muestran las más altas concentraciones de arsénico. Los tejidos que retienen por mayor tiempo As, expuestos a su forma dimetilada, son el pulmón, la tiroides y el cristalino de los ojos (Dock y Vahter, 1998).

El NaAsO_2 y el NaAsO_3 inducen alteraciones morfológicas de células de roedor en cultivo (Lee et al., 1985). La concentración para la inducción de estos cambios son las mismas que son requeridas para la amplificación de genes (Lee et al., 1988). El NaAsO_2 es más potente que el NaAsO_3 en estos ensayos biológicos y se ha sugerido que es debido a diferencias en la incorporación celular del arsénico trivalente en relación al arsénico pentavalente.

1.2.7 Efectos en el sistema inmune

El arsenito es un compuesto que tiene efectos inmunotóxicos, alterando la inmunidad humoral y celular (Gonsebatt et al., 1992; Yoshida et al., 1986; Vega et al., 1999). El arsenito puede suprimir la respuesta inmune por la inducción de apoptosis en células del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos y células derivadas de linfoma) (Rousset et al., 1999; Wolson et al., 1990). Alternativamente, el arsenito puede interferir también con la inmunidad por interacción con enzimas involucradas en la respuesta inmune. El arsénico trivalente puede inducir apoptosis en células del sistema inmune a concentraciones que están presentes en los individuos expuestos crónicamente (Harrison y McCoy, 2001). Se sabe que existe un incremento en la susceptibilidad a infecciones con pseudorabia y al virus de la encefalitis en ratones tratados con arsenito de sodio (NaAsO_2), trióxido de arsénico (AsO_3) o arsenato de sodio (Na_2HAsO) (Vega, 1998).

Cuando ratones son expuestos a arsenuro de galio (GaAs), la producción de IgM decrece en el 97% de los animales y la actividad de los macrófagos se ve reducida (Sikorski et al., 1991). Un efecto similar fue observado cuando se expusieron a NaAsO_2 (Sikorski et al., 1991). El tratamiento de ratones con GaAs disminuye la expresión del receptor de IL-2, lo cual sugiere que los compuestos de arsénico pueden afectar la activación de la célula T y su función, probablemente por interferencia con las señales primarias o secundarias que dirigen la respuesta antigénica, comprometiendo la respuesta inmune celular (Burns et al., 1991). También, se ha demostrado que el NaAsO_2 inhibe la producción de interferón en ratones (Blakley et al., 1980). Dosis de 26.6 mg/kg en ratas incrementan el peso del hígado, bazo, glándulas adrenales y testículos, disminuye el peso del timo y deprime la hipersensibilidad retardada, pero no afecta el número de células formadoras de placa IgM en estos animales (Instiróris et al., 2000). La presencia de NaAsO_2 2.5-3.0 μM *in vitro* provoca una reducción en la proliferación en linfocitos T humanos de sangre periférica inducida por

PHA, así como una concentración de 6-10 μM de NaAsO_2 tiene el mismo efecto en linfocitos T bovinos de sangre periférica (Burns et al., 1991). Por otro lado una concentración de NaAsO_2 de 0.5-1.0 μM disminuye la cantidad de células formadoras de placa en bazo de ratón (Descotes, 1986).

Se sabe que el arsenito induce activación de algunas proteínas MAP cinasas (Burns et al., 1991), algunas de las cuales juegan un papel clave en la inducción de apoptosis en células linfoides. Existe evidencia de que microdominios de la membrana plasmática de células de mamíferos, enriquecidos con colesterol y glicosfingolípidos llamados "rafts", juegan un papel importante en la señalización intracelular esencial para una efectiva transducción de señales del TCR. El arsenito de sodio también induce la activación de caspasas a través de microdominios lipídicos de la membrana celular promoviendo la producción de superóxidos y la activación de JNK (Hossain et al., 2000).

1.3 ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T

La activación de los linfocitos T es consecuencia de múltiples interacciones ligando-receptor que ocurren en la interfase de una célula T y una célula presentadora de antígeno. Esta interacción inicia eventos bioquímicos intracelulares en la célula T que hacen que los linfocitos T entren en mitosis y adquieran su actividad efectora, que culmina en la respuesta inmune celular. La activación del linfocito es controlada por rutas de señalización iniciadas por los receptores del antígeno y moléculas coestimuladoras. El ligando fisiológico para la activación de la célula T es un péptido extraño unido a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), presentado en la superficie de una célula presentadora de antígeno (Acuto y Cantrell, 2000). Por otra parte, existen productos derivados de bacterias y virus que pueden activar a una gran cantidad de células T a los que se les denomina superantígenos. Estos superantígenos estimulan a las células T debido a su capacidad de interactuar con algunas regiones del TCR que están fuera del sitio de unión péptido-MHC. Existen otras moléculas como las lectinas que se han usado para estimular de forma policlonal a los linfocitos T. Las lectinas son proteínas derivadas de las plantas que se caracterizan por poseer en su estructura varios grupos de carbohidratos. Éstas pueden inducir una respuesta proliferativa, son comúnmente llamadas mitógenos, y entre los cuales encontramos a la fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (Con A) y el mitógeno pokeweed (PWM). Éstos se unen a las glucoproteínas expresadas en la membrana plasmática y entrecruzan receptores importantes involucrados en la activación fisiológica de las células T. Anticuerpos dirigidos contra el TCR o CD3 así como ionóforos de calcio también han sido usados para estimular a las células T (Paul et al., 1998).

Las señales bioquímicas iniciadas por el receptor de la célula T determinan la especificidad de la activación, pero los eventos iniciados por otras proteínas de membrana tales como los receptores del MHC CD4/CD8, coestimuladores como CD2, CD28 e integrinas, modulan las señales intracelulares requeridas para iniciar la activación de una célula T (Acuto y Cantrell, 2000).

El receptor de las células T está compuesto por las cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ que se asocian a las cadenas del CD3 γ , δ , ϵ y ζ (Fig 2). Durante la activación, las cadenas del CD3 se fosforilan rápidamente en los residuos de tirosina, por las cinasas de residuos de tirosina Fyn y Lck. Fyn interactúa directamente con el complejo CD3, mientras que Lck se une a las regiones citoplásmicas de las moléculas correceptoras CD4, CD8 y CD2.

Una vez que los inmunorreceptores con motivos de activación basados en tirosina (ITAMs) de las cadenas del receptor han sido fosforilados, pueden reclutar a la cinasa de tirosina fosforilada en residuos de tirosina ZAP-70. Ésta se une a la cadena ζ fosforilada en residuos de tirosina del CD3 y es activada por la interacción de SH2 y la fosforilación directa por Lck. Una vez activada ZAP-70, el siguiente paso incluye a la enzima fosfolipasa C- γ (PLC- γ) que sirve para propagar la señal a la membrana celular y eventualmente comunicarla al núcleo. La fosforilación de un residuo de tirosina en la PLC- γ activa a la enzima, la cual rompe al fosfatidilinositol bifosfato, que es un fosfolípido de membrana, en dos partes: el inositol trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). La difusión de IP₃ tiene como consecuencia la liberación de Ca²⁺ en el citosol proveniente de vesículas del retículo endoplásmico por lo que hay un incremento inmediato en la concentración de Ca²⁺ intracelular, esto dispara la apertura de los canales de Ca²⁺ en la membrana plasmática, lo cual provoca un mayor incremento de Ca²⁺ dentro de la célula que conduce a la activación de la calmodulina (proteína que se une a Ca²⁺ para su activación). La activación de esta proteína es requerida para la translocación al núcleo del factor nuclear de las células T activadas (NF-AT) el cual es esencial en la activación del gen de IL-2 (Abbas, 2000).

El otro producto del rompimiento de PIP₂ es DAG, el cual permanece asociado con la superficie interna de la membrana plasmática. El DAG ayuda a activar a la proteína cinasas C (PKC), que fosforila residuos de serina/treonina, y que se cree inicia una cascada de señalización dirigida al núcleo.

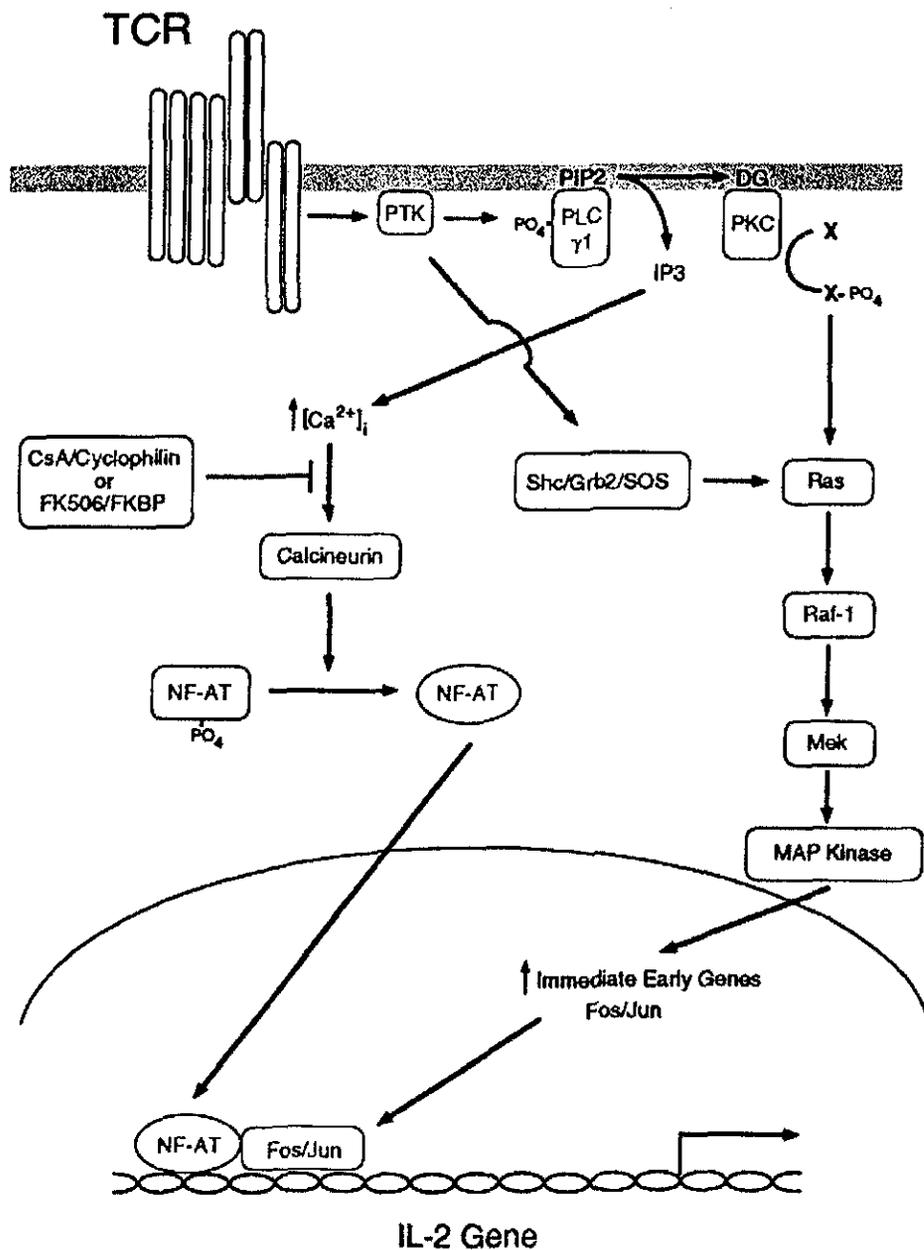


Figura 2. Modelo de la transducción de señales mediadas por el TCR dirigidas a la transcripción del gen de la IL-2 (Paul et al. 1998).

Otra señal que es requerida para la respuesta de las células T es la activación de proteínas pequeñas G, las cuales son proteínas que sirven para propagar señales de los receptores asociados a tirosin-quinasas. Las proteínas G pequeñas se encuentran normalmente en un estado inactivo unidas a GDP; su activación involucra al factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) el cual intercambia GDP por GTP. Ras y otras proteínas pequeñas G son reclutadas en el sitio del receptor por proteínas adaptadoras y son activadas por los GEFs unidos a las proteínas adaptadoras. Una vez activada, Ras activa la cascada de proteínas cinasas conocidas como proteínas-cinasas activadas por mitógeno (MAP cinasas). La cascada de MAP cinasa conduce directamente a la fosforilación y activación de factores de transcripción en el núcleo. En particular, la familia de factores de transcripción AP-1, que son heterodímeros de los oncogenes *fos* y *jun*, así como NF-AT (nuclear factor of activation in T cells) y NF- κ B que son factores de transcripción involucrados en la regulación del gen de la IL-2 (Fig 2), así como del gen de la subunidad α del RIL-2 (CD25) (Paul, 1998).

1.3.1 CD4 y CD8

CD4 y CD8 son moléculas determinantes no polimórficas expresadas en la superficie de las dos principales subpoblaciones de células T maduras. Estas moléculas se unen a regiones no polimórficas del MHC clase II y clase I respectivamente y están acopladas a la cinasa de residuos de tirosina p56lck. Ambos complejos liberan señales accesorias que sinergizan con el complejo TCR/CD3 en complemento en la activación de las células T. En general, las células CD4⁺ están involucradas en la función cooperadora celular, en respuesta a antígenos exógenos. Por el contrario, las células T CD8⁺ son las células efectoras citolíticas y reconocen péptidos que son derivados de la vía biosintética endógena (Paul, 1998).

CD4 y CD8 son glucoproteínas integrales de membrana. El dominio extracelular del CD4 consiste de cuatro dominios de inmunoglobulina unidos en tandem. Los dominios N-terminal interactúan con el dominio β 2 de las moléculas de MHC clase II. CD8 es un heterodímero de una cadena α y una cadena β , pero puede ser expresada como un homodímero de cadenas α/α . El dominio N-terminal de inmunoglobulina de la cadena α se une a el dominio α 3 de las moléculas de MHC clase I (Paul, 1998)

Los correceptores CD4 y CD8 pueden contribuir a la formación de una interacción más estable del TCR con el complejo que forma el MHC con el péptido, y también están involucrados en eventos de transducción de señales por la interacción de sus dominios intracelulares con la cinasa Lck. Ambos correceptores interactúan no covalentemente con la región N-terminal de Lck vía

residuos de cisteína apareados. La interacción de Lck con CD4 es de mayor afinidad que con CD8. La unión del TCR con estos correceptores puede incrementar la transducción de señales por el TCR. En la respuesta inmune, se requiere del CD4 o CD8. En general, los anticuerpos dirigidos contra CD4 y CD8 pueden bloquear la respuesta de los subtipos celulares a los antígenos durante la respuesta primaria pero no en la respuesta secundaria. El grado de participación de una célula T individual CD4 o CD8 es altamente dependiente de la clona. En el caso de CD4, su contribución a la respuesta al antígeno depende no sólo de su dominio extracelular que interactúa con el MHC clase II, sino también de las secuencias en su dominio citoplásmico que interactúa con Lck (Paul, 1998).

Se han reportado alteraciones en las funciones de estas moléculas por algunos compuestos de Fe. *In vitro* el Fe disminuye la eficiencia clonal de las células T CD4⁺ y suprime la proliferación de los linfocitos activados con mitógenos como PHA o Con A. Se sabe que el citrato férrico modula los complejos CD4-lck y CD8-lck en linfocitos T de sangre periférica humana en reposo y reduce la expresión de CD4 en la superficie de linfocitos T en reposo. (Arosa y Sousa, 1995).

I.3.2 CD69

El CD69 humano es un homodímero de superficie formado por la asociación de dos cadenas, una de 28 kDa y otra de 32 kDa, unidas por puentes disulfuro. Las dos cadenas resultan de la glucosilación diferencial de un polipéptido de 199 aminoácidos de largo y codificado por un solo gen. Este producto puede ensamblarse en dímeros 28-28, 28-32 y 32-32 kDa; existen también dímeros menos frecuentes que son los no glicosilados de 22-22 kDa. Existe sólo un sitio potencial de glucosilación, para una N-glucosilación en la parte extracelular de cada cadena, que está localizado en el a.a. 166, sugiriendo una heterogeneidad cualitativa en la glucosilación de la cadena. En la parte intracelular presenta 8 residuos de serina, de los cuales, las de las posiciones 18 y 30 representan sitios potenciales de fosforilación para la caseína cinasa II (CKII) y la proteína cinasa C (PKC), respectivamente. En células tanto humanas como de ratón existe una fosforilación constitutiva.

La porción extracelular de la molécula (138 a.a.) contiene un dominio tipo C de unión a lectinas (C-type lectin-binding), el cual pone a CD69 dentro de la familia de receptores de superficie tipo lectinas C (C-type lectin family of surface receptors). Seis residuos de cisteína que son conservados entre las especies son responsables de la estructura del dominio y posiblemente de la unión entre cadenas (Hutchinson et al., 1999).

CD69 fue inicialmente descrito como un antígeno expresado en la activación temprana de células linfoides. Linfocitos de sangre periférica en reposo no expresan CD69, pero es rápidamente inducido por la estimulación de la célula T por medio del receptor TCR/CD3, entrecruzamiento de la inmunoglobulina de membrana en las células B y por IL-2, IFN- γ o estimulación de CD16 en células NK. En las células T, los transcritos de CD69 son detectables a los 30-60 min después de la estimulación de CD3 y declina rápidamente después de 4-6 horas. La expresión en la superficie puede ser detectada a las 2-3 h y el pico de expresión ocurre a las 18-24 h (Angulo y Fulcher, 1998; Santis et al., 1995). La expresión declina con tiempo medio de ~ 24 h si se quita el estímulo. La inducción de CD69 requiere el incremento sostenido de la concentración de calcio citosólico. El incremento de Ca^{2+} es transitorio, pues cae en menos de 5 min provocando la expresión de CD69. La elevación prolongada de Ca^{2+} , que sigue del entrecruzamiento óptimo del TCR/CD3 es igualmente necesaria para sostener la activación de PKC, que es un importante requerimiento para la inducción de CD69 en linfocitos T. Sin embargo, el evento clave responsable de la expresión de CD69 en células linfoides parece ser la activación de Ras. La expresión del gen de *v-Ha-ras* que codifica para una proteína de tipo "GTP-bound active Ras" es suficiente para inducir óptimamente CD69 cuando ocurre la estimulación del linfocito T por medio del TCR/CD3, que sugiere un papel central de Ras en la expresión de CD69 en células T (Rutella et al., 1999).

CD69 es expresado constitutivamente en las plaquetas, en las que presenta características bioquímicas similares al CD69 expresado en células NK y T, incluyendo la fosforilación constitutiva. También ha sido encontrado en precursores mieloides en médula ósea, neutrófilos activados y eosinófilos, en monocitos circulantes y células de Langerhans epidermales. Esta amplia distribución implica un papel general para CD69 en la biología de las células hematopoyéticas (Testi et al., 1994).

Se ha demostrado que la estimulación de CD69 en presencia de PMA induce la expresión transitoria del gen *c-fos* y la formación del complejo AP-1 en células T. También se ha encontrado que la inducción del complejo AP-1, junto con la inducción del complejo NF-AT, después del entrecruzamiento de CD69 en presencia de PMA, participa en la regulación transcripcional de la expresión del gen de IL-2 en linfocitos T (Testis et al., 1994).

I.3.3 Interleucina 2

Dentro del sistema inmune periférico, la producción de IL-2 está confinada principalmente a la población de linfocitos T CD4⁺. La secreción de IL-2 es uno de los principales eventos en la activación de la célula T y es el resultado final de una cascada de segundos mensajeros que

integran señales de múltiples receptores de la superficie celular que relacionan a las células T con su microambiente (Fernández-Botran et al., 1996; Gaffen et al., 1998; Paul et al., 1998; Smith, 1988).

La IL-2 humana es una glucoproteína de 15 kD (Gaffen et al., 1998), con un dominio de unión a lectinas, el cual tiene un papel crítico en el tránsito y ruta intracelular de esta molécula. La IL-2 presenta un puente disulfuro, cuya ruptura elimina su actividad biológica. La estructura tridimensional de la IL-2 humana se ha descrito de acuerdo a los datos cristalográficos con una resolución de 3-Å y a la predicción de la estructura secundaria derivada de la comparación de las secuencias primarias de citocinas relacionadas. El "núcleo" de la IL-2 está constituido por cuatro hélices α antiparalelas y dos asas entrecruzadas que contienen hojas β (Fig 3) (Gaffen, 1998; Rozwarski et al., 1994; Smith, 1988; Smith, 1992).

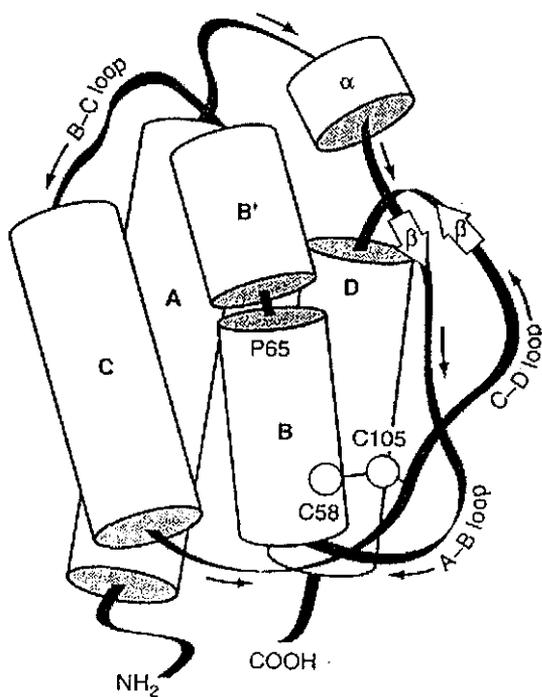


Figura 3. Modelo de la estructura tridimensional de la IL-2 humana (Gaffen et al. 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La secuencia esencial de aminoácidos de esta proteína es similar en varias especies de mamíferos, incluyendo una estricta conservación de tres residuos de cisteína. Los 153 aminoácidos de la IL-2 de su traducción primaria sufren un procesamiento postraduccional que incluye: el corte de 20 residuos de aminoácidos que forman el péptido señal, la adición de carbohidratos al residuo de treonina en la posición 3 (thr-3) y la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 58 y 105 (Smith, 1992; Robb y Greene, 1987).

Los efectos biológicos de la IL-2 están mediados por receptores específicos presentes en las células blanco. El receptor funcional de alta afinidad de la IL-2 (RIL-2) está compuesto de tres distintas subunidades asociadas a la membrana: una cadena α de 55 kDa, una cadena β de 70-75 kDa y una cadena γ de 64 kDa (Paul et al., 1998; Smith, 1992). El extremo N-terminal de la hélice A de la IL-2 es la que se une a la subunidad β del complejo receptor de la IL-2. El asa que conecta a las hélices A y B de la IL-2 se une a la subunidad α del receptor de IL-2 y el extremo C-terminal de la hélice α puede ser la responsable de la interacción con la cadena γ del receptor (Gaffen et al., 1998).

El gen de la IL-2 humana está localizado en el cromosoma 4q en las bandas 26-28 (Seigel et al., 1984). *In vivo* la expresión de este gen es inducible y es regulada a nivel transcripcional por un elemento "enhancer" 5' (Ullman et al., 1990). Entre las secuencias *cis* que se han identificado en el gen de la IL-2 que actúan como secuencias reguladoras, están los sitios de unión para NFAT-1, NF- κ B, AP-1 y OCT-1 (Janeway et al., 1999). La expresión del gen de la IL-2 es regulado postranscripcionalmente a través de un mecanismo que implica la estabilización del RNA mensajero del IL-2, mediado por una secuencia rica en AU que se encuentra en la región 3'-no transcrita del mensajero (Ullman et al., 1990).

La cantidad de IL-2 secretada por los linfocitos T CD4⁺ es un factor determinante de la respuesta inmune, ya que ejerce efectos pleiotrópicos, participando en la regulación de células activadas por antígenos, estimulando el crecimiento de células NK y monocitos, la secreción de anticuerpos e induciendo la secreción de IFN- γ en células NK y T CD8⁺ (Gaffen et al., 1998; Peltier et al., 1999).

La síntesis *de novo* y la secreción de IL-2 es disparada por antígenos, anticuerpos anti-CD3 o mitógenos que inducen la activación de los linfocitos T maduros. La unión de la IL-2 a su receptor de alta afinidad, un evento que ocurre a través de un mecanismo parácrino o autócrino, promueve la expansión de las células T induciendo la progresión del ciclo celular de G1 a S, G2 y M. Esta

propiedad de promover el crecimiento celular es la mejor caracterizada y quizá la más importante función de esta linfocina. Algunas evidencias han sugerido que la IL-2 es importante en el desarrollo tímico (Gaffen et al., 1998). La expresión de IL-2 y su receptor en el timo se han detectado y los efectos proliferativos de la IL-2 en timocitos han sido reportados (De la Hera et al., 1986; De la Hera et al., 1987; Toribio et al., 1989). Anticuerpos dirigidos contra el receptor de la IL-2 han demostrado la inhibición del desarrollo tímico (Kündig et al., 1993). La IL-2 también parece ser un factor de diferenciación ya que es capaz de inducir la producción de otras linfocinas como IFN- γ e IL-4 (Farrar et al., 1982; Howard et al., 1983). Por otro lado, células tales como linfocitos B, células NK, macrófagos y monocitos primarios de sangre periférica presentan en la superficie receptor para IL-2 (Janeway et al., 1999).

Una variedad de diferentes estados de inmunodepresión están asociados con una producción reducida de IL-2. Estados de inmunodeficiencia heredados tales como la inmunodeficiencia severa combinada, el síndrome de Nezelof, y la agamaglobulinemia de Burton, son caracterizados por una secreción defectuosa de IL-2 por los linfocitos de sangre periférica. De manera similar, la inmunodeficiencia adquirida, provocada por una irradiación linfóide total, terapia con ciclosporina A, glucocorticoides o ciclofosfamida, edad avanzada, parasitosis, tumores sólidos o infección con el virus de la inmunodeficiencia humana están acompañados por alteraciones en la secreción de IL-2 (McCabe, 1997).

La producción de IL-2 es inhibida por una serie de mediadores producidos durante el proceso inflamatorio. Los glucocorticoides actúan en el curso de la respuesta inmune sistémica, inhibiendo selectivamente la producción de IL-2 por las células Th1. La IL-10 también regula negativamente la producción de IL-2 (Redondo et al., 1998; Lu y Sharom, 1995).

1.3.4 Receptor de IL-2

El receptor de la IL-2 humana está formado por la subunidad α (p55, Tac, CD25), está codificado por un gen en el cromosoma 10, p14-15 (Leonard et al., 1985). La proteína madura contiene un dominio extracelular de 219 aminoácidos, una región transmembranal de 19 aminoácidos y un dominio C-terminal intracelular de 13 aminoácidos. El dominio extracelular de la proteína contiene 11 cisteínas, algunas de las cuales participan en puentes disulfuro intracadena (Fig 4). El rompimiento de cualquiera de estas uniones inter-cisteínas reduce en gran parte la capacidad de IL-2R α de unirse a la IL-2. Estudios de delección interna han demostrado que los 163 aminoácidos de la región N-terminal contienen toda la información necesaria para unir a la IL-2 (Burns y Munson, 1993).

La subunidad β (p70), está codificada por un solo gen localizado en el cromosoma 22, q11.2-12. Tiene un peso molecular de 58.3 kDa. Contiene un dominio extracelular de 214 aminoácidos con cuatro sitios potenciales de N-glicosilación y ocho residuos de cisteínas, una región transmembranal de 25 aminoácidos y un dominio citoplásmico de 286 aminoácidos. Los 112 aminoácidos del extremo N-terminal son suficientes para unir a su ligando en ausencia de otras subunidades del receptor (Fig 4).

La cadena γ (p64) del receptor de IL-2 humano está codificada por un solo gen localizado en el cromosoma X, q13. La proteína contiene un dominio extracelular de 232 aminoácidos, un dominio transmembranal de 29 aminoácidos y un dominio citoplásmico de 86 aminoácidos. El dominio extracelular contiene algunas características que lo identifican como miembro de la superfamilia de receptores de citocinas. La cadena γ también forma parte de los complejos receptores para la IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 (Fig. 4) (Gaffen et al., 1998).

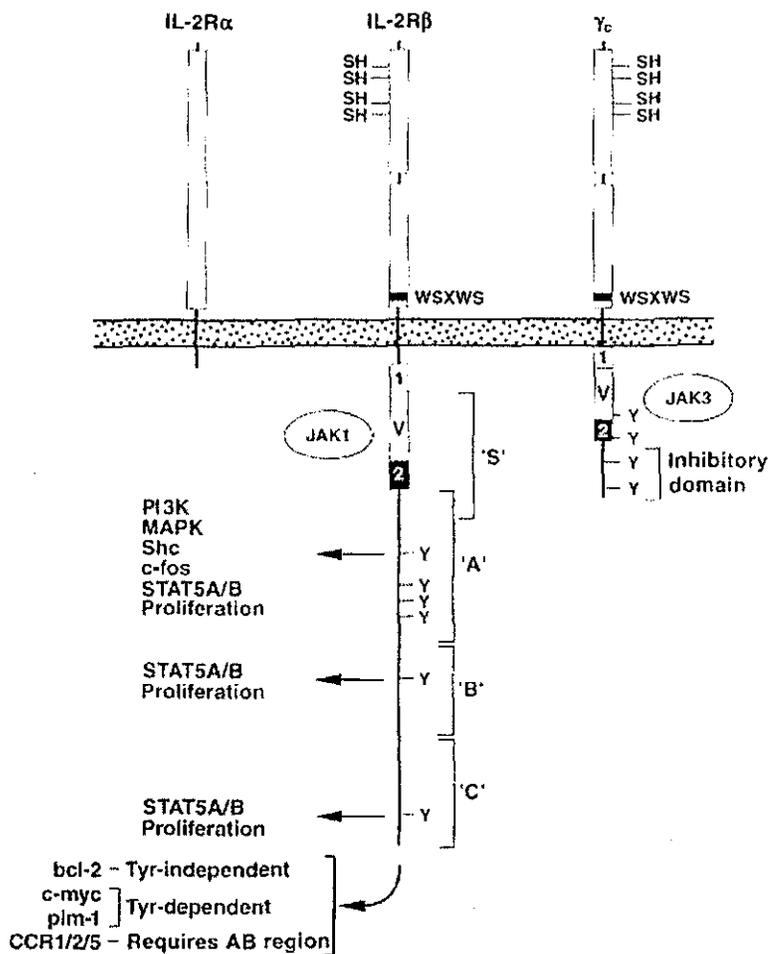


Figura 4. Modelo de la transducción de señales por el complejo del receptor de IL-2 (Gaffen et al. 1998).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

II. HIPÓTESIS

El NaAsO₂ reduce los índices mitótico y de replicación en linfocitos T humanos de sangre periférica estimulados con PHA, lo que produce una disminución en su proliferación y también provoca una disminución en la secreción de IL-2, a las 24 h de ser estimulados. El NaAsO₂ interfiere con el ensamble de los microtúbulos y con la estabilidad del citoesqueleto en estas células.

Ya que el citoesqueleto es el responsable de la organización estructural del aparato de Golgi, el cual es necesario para la secreción de proteínas, se propone que si el arsénico altera el citoesqueleto y por lo tanto afecta el transporte intracelular y la secreción de la IL-2 está disminuida porque habrá una acumulación de esta linfocina dentro de la célula.

III. OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto el NaAsO₂ en la proliferación de linfocitos T derivados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas por diversos métodos.
2. Analizar la expresión de moléculas implicadas en la activación y en la proliferación de los linfocitos T.
3. Determinar la producción y secreción de la IL-2

II. HIPÓTESIS

El NaAsO₂ reduce los índices mitótico y de replicación en linfocitos T humanos de sangre periférica estimulados con PHA, lo que produce una disminución en su proliferación y también provoca una disminución en la secreción de IL-2, a las 24 h de ser estimulados. El NaAsO₂ interfiere con el ensamble de los microtúbulos y con la estabilidad del citoesqueleto en estas células.

Ya que el citoesqueleto es el responsable de la organización estructural del aparato de Golgi, el cual es necesario para la secreción de proteínas, se propone que si el arsénico altera el citoesqueleto y por lo tanto afecta el transporte intracelular y la secreción de la IL-2 está disminuida porque habrá una acumulación de esta linfocina dentro de la célula.

III. OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto el NaAsO₂ en la proliferación de linfocitos T derivados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas por diversos métodos.
2. Analizar la expresión de moléculas implicadas en la activación y en la proliferación de los linfocitos T.
3. Determinar la producción y secreción de la IL-2

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. SOLUCIONES PARA CULTIVO DE CÉLULAS

IV.1.1 Medios de cultivo

Se utilizó medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con HEPES 25mM (SIGMA) y 0.2% de NaHCO_3 (SIGMA). La composición de los diferentes medios usados se muestra a continuación:

COMPOSICIÓN	MEDIOS		
	A	B	C
Aminoácidos no esenciales (10 mM)(GIBCO)	X	X	X
Piruvato de sodio (1mM) (GIBCO)	-	X	X
Glutamina (2mM) (GIBCO)	X	-	X
β -mercaptoetanol (50 μ M) (SIGMA)	-	-	X
Suero fetal bovino (10%) (GIBCO)	X	X	X

Tabla 1. Composición de los diferentes medios empleados

IV.1.2 Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS)

NaCl	138 mM
KCl	2.7 mM
KH_2PO_4	1.2 mM
Na_2HPO_4	8.1 mM
H_2O bidestilada	1000 ml
pH	7.2

IV.1.3 NaAsO_2

Se preparó una solución estéril de NaAsO_2 (Sigma) 1M en H_2O bidestilada estéril y se filtró por un filtro de 0.22 μ m (Millipore) y se guardó a -20°C . Por diluciones se obtuvieron las concentraciones finales deseadas. A los cultivos de células mononucleares se agregaron las diluciones de NaAsO_2 en medio completo.

IV.2 CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

IV.2.1 Donadores de sangre

Se obtuvo sangre entera heparinizada (10 unidades de heparina (SIGMA) por ml de sangre), por venopunción de 8 donadores sanos, no fumadores, varones, de 22-40 años y mujeres entre 22-35 años. La sangre se usó inmediatamente después de obtenerse.

IV.2.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

La sangre periférica heparinizada obtenida de los donadores se diluyó 1:1 (vol/vol) con DPBS (Dubelco's Phosphate Buffer Saline). Diez ml de sangre diluida se vertió lenta y cuidadosamente sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) a 37°C en tubos cónicos de 15ml (Nalge Nunc). Se aislaron las células mononucleares por centrifugación (30 min a 469 x g) a temperatura ambiente. Las células de la interfase se recuperaron con pipeta Pasteur y se resuspendieron en DPBS. Se lavaron con el mismo buffer 2 veces (lavar se considera resuspender a las células en medio o DPBS y centrifugar 5 min a 469 x g) y se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo A.

IV.2.3 Ensayo de proliferación: incorporación de [³H]-timidina.

Se sembraron 10⁵ células mononucleares por pozo en 50 µl de medio completo A en cajas de cultivo de 96 pozos (Costar) y se agregaron 50 µl de medio completo A con NaAsO₂ para tener una concentración final de 0.01, 0.1 y 1.0 µM, por triplicado. Se incubaron las células durante 24 h y posteriormente se agregaron 50 µl de medio completo A con fitohemaglutinina (PHA, GIBCO), 50 µl por 10⁶ células y 50 µl de medio completo con NaAsO₂, para mantener la concentración de 0.01, 0.1 y 1.0 µM, en un volumen final de 200 µl por pozo. Las células se incubaron por 48 h más y 16-18 h antes de cosecharlas se agregaron 20 µl de medio / pozo con [³H]-timidina (0.5 µCi por pozo) (Amersham Pharmacia Biotech). Las células se cosecharon en un cosechador automático (Skatron). La incorporación de [³H]-timidina se midió por espectroscopía en un contador Betaplate (Wallac). Los resultados se reportan en porcentaje de incorporación de [³H]-timidina (media de cpm de células expuestas a As / media de cpm de células no expuestas a As por 100).

IV.2.4 Ensayo de proliferación: obtención de sobrenadantes y citometría de flujo

Un millón de células mononucleares fueron sembradas por pozo en cajas de 24 pozos en 1 ml de medio completo A con 0.01, 0.1 y 1.0 μM de NaAsO_2 e incubadas por 24 h, luego se estimularon con 10 μl de PHA / 10^6 células en medio completo A, manteniendo la concentración de 0.01, 0.1 y 1.0 μM de NaAsO_2 en un volumen final de 2 ml. Se mantuvieron en cultivo por 48 h más y al término de la incubación se recuperaron las células y se centrifugaron 5 min. 469xg; el sobrenadante de cada muestra se recuperó, se pasó por un filtro de 0.22 μm (Millipore) y se guardaron a -20°C para posteriormente cuantificar la IL-2 secretada por los linfocitos. Las células fueron utilizadas para la determinación de IL-2 intracelular por citofluorometría.

IV.3 DETERMINACIÓN DE IL-2

IV.3.1 Cultivo de células CTLL-2

La línea celular CTLL-2 dependiente de interleucina-2 (IL-2) fue cultivada en botellas de cultivo de 25 cm^2 (Nunc) con 5ml de medio completo C y 4 U/ml de IL-2 recombinante humana (Boehringer Mannheim). Las células se diluyen 1/20 cada 3-4 días con medio completo C, agregando nuevamente IL-2 recombinante humana para mantener el cultivo ya que las células son dependientes de IL-2. Las células tienen una apariencia amorfa cuando están viables y creciendo, misma que se redondeada cuando los nutrientes y la IL-2 se consumen.

IV.3.2 Cuantificación de IL-2 por bioensayo

Las células CTLL-2 para ser utilizadas como un bioensayo en la cuantificación de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T expuestos a As, debían estar en gran concentración y con la menor cantidad de IL-2 en el medio; esto se tiene cuando las células comienzan a tomar una forma redondeada y el medio de cultivo se acidifica ligeramente después de dos o tres días de cultivo (dependiendo de la última dilución hecha). Las células bajo las condiciones anteriormente mencionadas se recuperaron de las botellas de cultivo y se lavaron 3 veces con medio completo C sin IL-2 recombinante humana (5 min a 469xg), luego se resuspendieron en 10 ml del mismo medio y se incubaron por 4 h. Posteriormente se lavaron 3 veces más y se resuspendieron en medio completo C. Se sembraron 10^4 células CTLL-2 en 100 μl de medio completo C por pozo en cajas de 96 pozos y se agregaron diluciones de sobrenadantes (1:10, 1:30 y 1:100) de los cultivos

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

de células tratadas con As por triplicado en 100 μ l de medio completo C para tener un volumen final de 200 μ l por pozo. De forma paralela se hizo una curva estándar de IL-2 recombinante humana, en donde se agregaron cantidades conocidas de IL-2 recombinante humana (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 U/ml) en 100 μ l de medio completo C a 10^4 células en 100 μ l de medio completo C (para cada ensayo se hizo una curva estándar bajo las mismas condiciones experimentales) y se incubaron por 48 hrs. Cuatro a seis horas antes de cosecharlas se les dio un pulso de [3 H]-timidina (0.5 μ Ci por pozo en 20 μ l de medio completo C). Las células se cosecharon en un cosechador automático. La incorporación de [3 H]-timidina se midió por espectroscopía con líquido de centelleo en un contador Betaplate. Los resultados de los problemas se interpolaron en la curva estándar, y se reportan como unidades de IL-2.

IV.4. CITOFUOROMETRÍA

VI.4.1 CITOFUORÓMETRO (FACS)

El citómetro de flujo usado fue el FACScan (Beckton Dickinson) equipado con un láser de argón con una longitud de onda de excitación de 488 nm. Los parámetros de tamaño (Forward Scatter, FSC) y granularidad (Side Scattered Light, SSC) fueron colectados en una escala lineal. Las emisiones de los fluorocromos fueron detectadas a 530 nm (Isotiocianato de fluoresceína, FITC), 575 nm (Ficoeritrina, PE) y >613 nm (Cy-Crome 5 [Cy5] y Cy-Chrome [Cy-C]). El solapamiento de las diferentes longitudes de onda de emisión fueron minimizadas por una compensación electrónica antes de cada análisis. Se capturaron 10,000 ó 20,000 eventos como mínimo de cada muestra de acuerdo al ensayo. La calibración del citómetro fue hecha con microesferas fluorescentes (CaliBrite beads, Becton Dickinson). El análisis de las muestras capturadas se realizó en los programas Lysis II (Beckton Dickinson) y Cell Quest (Beckton Dickinson).

IV.4.2 REACTIVOS

IV.4.3 Anticuerpos usados

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Especificidad	Clase/Especie
Anti-CD3	FITC	OKT3	CD3 humano	IgG _{2a} ratón
Anti-CD3	FITC	UCHT1	Cadena ϵ del CD3 humano	IgG ₁ ratón
Anti-CD3	Cy-Chrome	UCHT1	Cadena ϵ del CD3 humano	IgG ₁ ratón
Anti-CD69	FITC	FN50	CD69 humana (Dímero)	IgG ₁ ratón
Anti-IL-2	PE	MQ1-17H12	IL-2 humana recombinante	IgG _{2a} rata
Anti-CD4	-	OKT4	CD4 humano	IgG _{2b} ratón
Anti-CD4	PE	RPA-T4	CD4 humano	IgG ₁ ratón
Anti-CD8	Cy5	DK25	CD8 humano	IgG ₁ ratón
Anti-CD8	-	OKT8	CD8 humano	IgG ₂ ratón
Control negativo	Cy5	Desconocida	Desconocida	IgG ₁ ratón
Control negativo	PE	Desconocida	Desconocida	IgG ₁ ratón

Tabla 2. Anticuerpos usados y sus características

IV.4.4 Diacetato de 5', 6' carboxifluoresceína, succinimidil ester (CFSE)

El CFSE (Molecular Probes) se resuspendió en DMSO para obtener una concentración de 5 mM. Se distribuyó en alícuotas de 10 μ l, las cuales se almacenaron a -20°C en vacío. Las alícuotas se usaron 1 o 2 veces como máximo y se desecharon.

IV.4.5 Solución de lavado y marcado para inmunofluorescencia

DPBS
NaN₃ 0.1%
suero bovino fetal 1%

IV.4.6 Solución de marcado para ciclo celular

Tris HCl 0.2 M pH 7.5
MgCl₂ 4 mM
Triton X-100 0.5% v/v
(Preparar fresco en cada ensayo)

IV.5 DETERMINACIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR CON CFSE

IV.5.1 Tinción con CFSE

Se obtuvieron células mononucleares como se describió previamente y 5×10^6 células se resuspendieron en 1 ml de DPBS con 1 μ l de CFSE 5mM; estas células se incubaron durante 15 min a 37° C con agitaciones ocasionales (3-4 veces durante la incubación). Para detener la reacción de tinción se agregaron 10 ml de medio completo B y se centrifugó 5 min a 469xg; se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio completo B para ser usadas en diferentes ensayos.

IV.5.2 Determinación de la división celular por citofluorometría con CFSE

Un millón de células mononucleares teñidas con CFSE por pozo en cajas de 24 pozos fueron incubadas en 2 ml de medio B con una concentración de arsenito de sodio de 1 μ M y estimuladas con 10 μ l de PHA/ 10^6 células durante 96 h. Al término de la incubación las células fueron recuperadas y lavadas 2 veces con DPBS a temperatura ambiente (5 min. 460xg) y finalmente fueron resuspendidas en 500 μ l de DPBS para ser analizadas en el citofluorómetro. Se midió la fluorescencia del CFSE usando un filtro de 519 nm (verde), que es la longitud de onda de emisión de este colorante. Se capturaron 20,000 eventos y los resultados se muestran como porcentaje de células divididas, según la fórmula descrita por Lyons (2000).

Para calcular el porcentaje de células divididas de las cuales surgieron las células que proliferaron, se obtiene el número de células en cada división dada (D_n) y se divide entre 2^{D_n} ; se repite el procedimiento para cada pico de división. La suma de los valores obtenidos representa el **número total de células precursoras** en el cultivo; para obtener la proporción de células que entraron a ciclo celular se divide el número **número total de células precursoras** entre la sumatoria de las células en M1 (que son las células que no se dividieron) + el **número total de células precursoras** y se multiplica por 100.

IV.6 Inmunofluorescencia directa

Se recuperaron las células del cultivo y se lavaron 3 veces con buffer de marcado a 4 °C y se centrifugaron 5 min a 469xg en tubos cónicos de 15 ml. Se contaron las células y se pusieron 10^6 células por tubo. Se agregaron 100 μ l de buffer de marcado con 1 μ g de anticuerpo marcado y

se incubaron 30 min a 4°C en oscuridad; finalmente se lavaron 3 veces con 2 ml de buffer de marcado frío y se resuspendieron en 500 µl de DPBS para ser inmediatamente analizadas en el citómetro. En caso de que no fuera posible analizarlas, se resuspendieron en 500 µl de DPBS con 1% p-formaldehído fresco y se guardaron en oscuridad a 4 °C. Una vez fijadas las muestras se pueden conservar hasta por una semana. Se capturaron 10,000 eventos y los resultados se reportan como porcentaje de células positivas para el antígeno analizado y media de la intensidad de fluorescencia.

IV.7 Inmunofluorescencia indirecta

Se recuperaron las células del cultivo y se lavaron 3 veces con buffer de marcado a 4 °C y se centrifugaron 5 min a 469xg en tubos cónicos de 15 ml. Se contaron las células y se colocaron 10⁶ células por tubo. Se agregaron 100 µl de sobrenadante de los cultivos de los hibridomas anti-OKT3, OKT4 y OKT8 (ver tabla 2); se incubaron a 4 °C durante 30 min y se lavaron 3 veces con buffer de marcado; se incubaron con 100 µl de un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a FITC (1:300 en buffer de marcado), durante 30 min en oscuridad, se lavaron tres veces con buffer de marcado y finalmente las células se resuspendieron en DPBS para ser analizadas en el citofluorómetro. Se capturaron 10,000 eventos y los resultados se reportan como porcentaje de células positivas para el antígeno analizado y media de la intensidad de fluorescencia.

IV.8 Determinación de IL-2 intracelular

Se recuperaron y se lavaron las células, se marcaron con anticuerpo anti-CD3-FITC como se mencionó en el apartado IV.6. Se resuspendieron en 250 µl de solución permeabilizadora y de fijación (Pharmingen) y se incubaron por 20 min a 4 °C; se lavaron 2 veces con 1 ml de solución de permeabilizado y lavado (Pharmingen) y finalmente se incubaron con 1 µg de anticuerpo anti-IL2-PE/ 10⁶ células en 100 µl de solución de permeabilizado y lavado + 100 µl de buffer de lavado. Se lavaron 2 veces con 1 ml de solución de permeabilizado y lavado, se resuspendieron en 500 µl de DPBS para posteriormente ser analizadas en el FACS. Se capturaron 10,000 eventos y los resultados se expresan en porcentaje de células positivas para CD3 e IL-2.

IV.9 Determinación de viabilidad por yoduro de propidio

Se recuperaron los linfocitos y se lavaron con DPBS 2 veces, se resuspendieron en 500 µl de DPBS y se adicionaron 10 µl de yoduro de propidio (Sigma) a una concentración de 1 µg/ml, se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se analizaron en el citofluorómetro. Se capturaron

10,000 eventos y los resultados se expresan como porcentaje de células viables (PI) en cada muestra.

IV.10 Ciclo Celular

Se recuperaron células del cultivo, después de 72 h de ser estimuladas con PHA, se lavaron con 5 ml de DPBS y 10^6 - 10^7 células fueron resuspendidas en 0.5 ml de DPBS hasta separarlas perfectamente. Posteriormente se fijaron las células en 4.5ml de etanol al 70% y se mantuvieron en incubación a 4 °C durante 2 h. Posteriormente se centrifugaron las células a 200xg y se lavaron con 5 ml de DPBS. Finalmente las células se resuspendieron en el buffer de marcado para ciclo celular adicionado con yoduro de propidio (50 µg/ml), y RNasa (50 µg/ml) y se analizaron en el citofluorómetro. Se capturaron 10,000 eventos y los resultados se expresan como porcentaje de células en fase G₀/G₁, S o G₂/M.

V. RESULTADOS

V.1 EFECTO DEL NaAsO₂ EN LA PROLIFERACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

Para determinar el efecto del arsénico en la proliferación celular, se realizaron ensayos de proliferación por incorporación de [³H]-timidina de células T de sangre periférica de 8 donadores sanos, de 21-38 años, no fumadores. Las células se trataron con NaAsO₂ durante 24 h y posteriormente se estimularon con PHA por 48 h. Estos ensayos de proliferación se repitieron dos o tres veces por cada donador en diferentes ocasiones para evaluar la variabilidad intraindividual del efecto del NaAsO₂.

Inicialmente se probaron dosis de 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 μM de NaAsO₂ en PBMC de 4 donadores: 2 varones (donadores A y B, Fig 5) y 2 mujeres (donadores C y D, Fig 5). Como se puede observar en la Fig. 5, todos los donadores presentaron una inhibición en la proliferación, de manera dosis-dependiente. Sin embargo, se observó variabilidad en el porcentaje de inhibición entre los diferentes donadores: a la concentración más baja (0.01 μM) el donador A no presentó inhibición alguna, mientras que el donador D presentó un 50% de inhibición; en el caso del donador C se observó un incremento de la proliferación, incluso en presencia de 0.1 μM. A concentraciones de 0.1 y 1.0 μM, se observó una disminución en la proliferación en todos los donadores, que va del 16% (donador C) hasta un 65% (donador D). En todos los casos se observó una inhibición > 98% en presencia de 10.0 μM; sin embargo, se ha reportado que a esta concentración el As tiene un efecto tóxico sobre las células (Salazar, 1998), por lo que en experimentos posteriores se trabajó con dosis de 0.01, 0.1 y 1.0 μM. De este experimento concluimos que el NaAsO₂ inhibe la proliferación de PBMC estimuladas con PHA, aún cuando el comportamiento de las células de los diferentes donadores varía en cuanto al porcentaje de inhibición.

Sin embargo, cuando se hicieron repeticiones del ensayo con estos mismos donadores observamos que el comportamiento de las células de las mujeres es variable, pues el arsénico no siempre disminuye la proliferación de estas células; incluso se observó que en ocasiones la presencia del As aumenta la proliferación celular, como se muestra en la Fig 6 A. En las células de los varones el comportamiento de inhibición de la proliferación siempre se mantuvo, aunque con pequeñas variaciones en el porcentaje de inhibición en la proliferación (Fig 6 B). Por esta razón decidimos trabajar sólo con donadores varones en los experimentos posteriores.

El siguiente experimento consistió en determinar si el efecto inhibitorio era observado en un mayor número de donadores y al mismo tiempo reproducible, por lo que se hicieron ensayos de

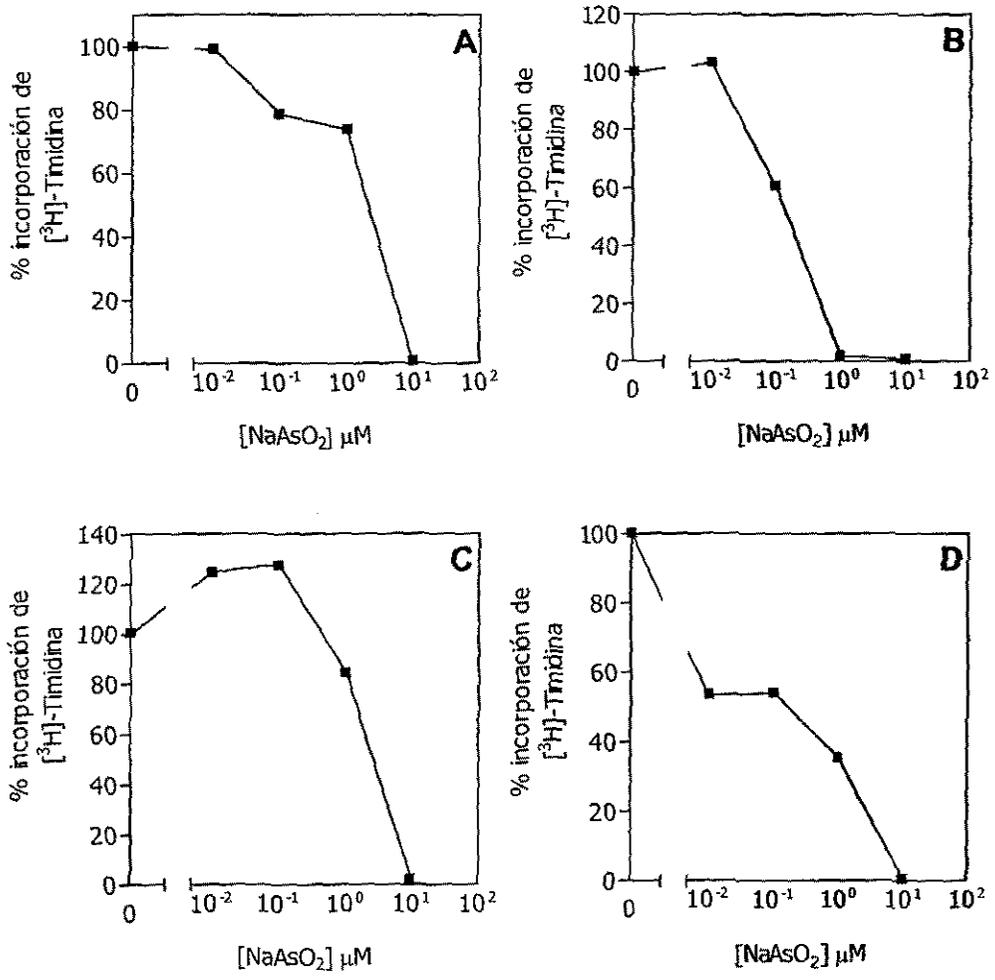


Figura 5. Inhibición de la proliferación de linfocitos T humanos de sangre periférica por NaAsO₂. Se incubaron PBMC durante 24 h con 0, 0.01, 0.1, 1.0 y 10 μM de NaAsO₂ y posteriormente se estimularon con PHA durante 48 h más. La proliferación se determinó por incorporación de [³H]-timidina. (A y B) varones, (C y D) mujeres.

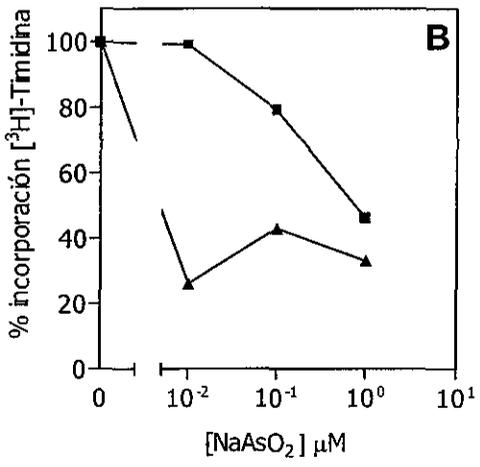
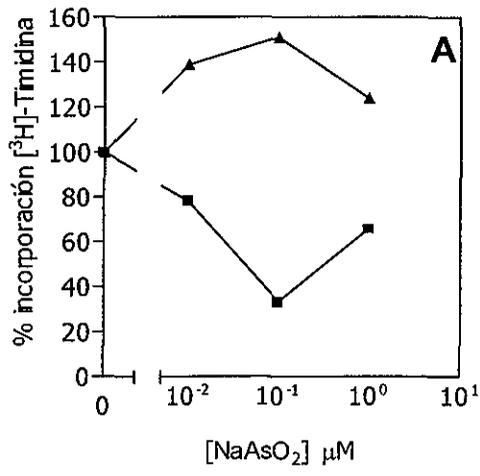


Figura 6. Proliferación de linfocitos T humanos de sangre periférica de dos donadores. Se incubaron PBMC durante 24 h con 0, 0.01, 0.1 y 1.0 μM de NaAsO₂ y posteriormente se estimularon con PHA durante 48 h más. La proliferación se determinó por incorporación de [³H]-timidina. (A) mujer, (B) varón. (■) 1er ensayo, (▲) 2º ensayo.

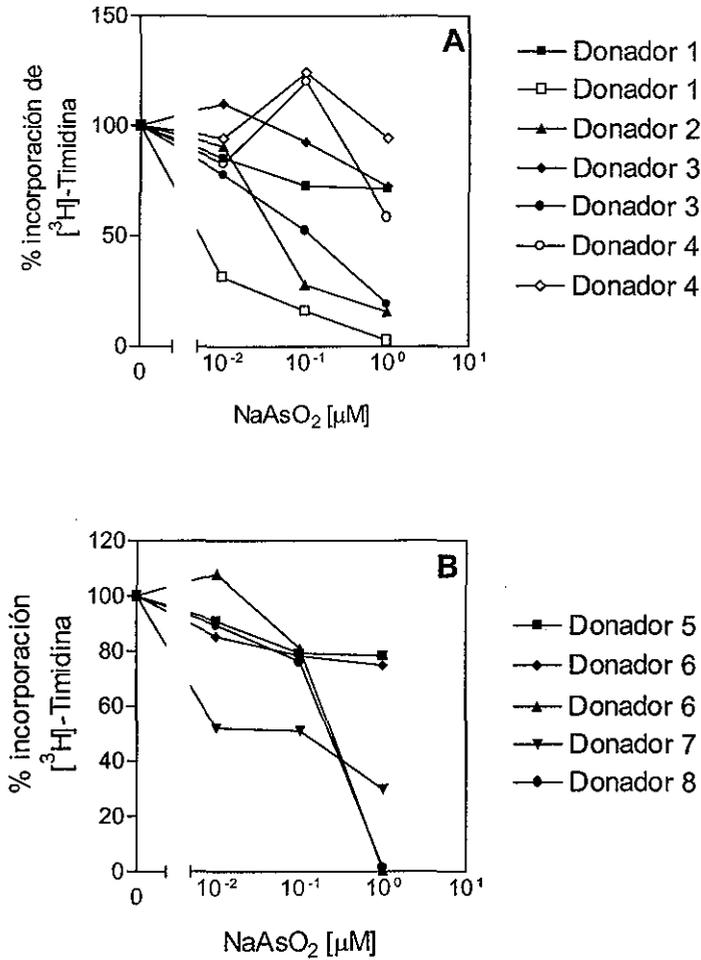


Figura 7. Proliferación de linfocitos T humanos tratados con NaAsO₂. Se incubaron PBMC durante 24 h con 0, 0.01, 0.1 y 1.0 μM de NaAsO₂ y posteriormente se estimularon con PHA durante 48 h más. La proliferación se determinó por incorporación de [³H]-timidina. (A y B) Donadores varones.

proliferación de células de 8 donadores varones en presencia de 0.01, 0.1 y 1.0 μM de NaAsO_2 (Fig 7). En estos experimentos encontramos que hay disminución en la proliferación de forma dosis-dependiente, aunque existen diferencias en el porcentaje de inhibición en la proliferación de los diferentes donadores que va del 6% (donador 4) al 98% (donador 1) (Fig 7 A), 98%, (donado 8) y 98% (donador 6) (Fig 7 B). Cuando las células fueron expuestas a 1.0 μM de NaAsO_2 , la tendencia a una disminución en la proliferación fue generalizada. Esta variación en el porcentaje de inhibición entre donadores se ha reportado en trabajos anteriores (Vega, 1998).

V.2 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN POR TINCIÓN CON CFSE

Tratando de obtener más información sobre el efecto del NaAsO_2 en la proliferación de los linfocitos T se decidió determinar la proliferación de estas células por medio de la técnica de tinción con CFSE.

El análisis de la proliferación de las células se hizo seleccionando una región (G1), que es la región donde se localizan las células blásticas, en una gráfica de tamaño (FSC-H) vs granularidad (SSC-H), y posteriormente se analizó la fluorescencia del CFSE de la región G1 en un histograma. Como se puede observar en la Fig 8, las células no expuestas a As presentan 7 picos de fluorescencia; el pico de la extrema derecha (M1) corresponde a las células sin dividirse, y cada pico hacia la izquierda corresponde a una división sucesiva, en las cuales el CFSE se diluye y por lo tanto las células contienen la mitad de fluorescencia del pico anterior. Por lo tanto, en esta gráfica podemos ver que las células que no fueron expuestas a As se dividieron 6 veces (picos M2 a M7). Sin embargo, las células expuestas a As se dividieron 5 veces (picos M2 a M6).

Al analizar el porcentaje de células en cada pico de división, encontramos que en las 3 primeras divisiones (picos M2-M4) hay mayor porcentaje de células en presencia de As, mientras que en las 2-3 últimas divisiones (picos M5-M7), el porcentaje de células en presencia de As es menor con respecto al control (Tabla 3). Estos resultados nos indican que la proliferación de los linfocitos T se encuentra retardada en presencia de NaAsO_2 .

Divisiones	Porcentaje de células		(Δ)
	0.0 μM NaAsO ₂	1.0 μM NaAsO ₂	
1	4.5	7.2	+2.7
2	6.8	12.3	+5.5
3	16.5	21.8	+5.3
4	23.2	17.6	-5.6
5	29.5	10.8	-1.9
6	9.0	0	-9

Tabla 3. Porcentaje de células en cada división expuestas y no expuestas a NaAsO₂.

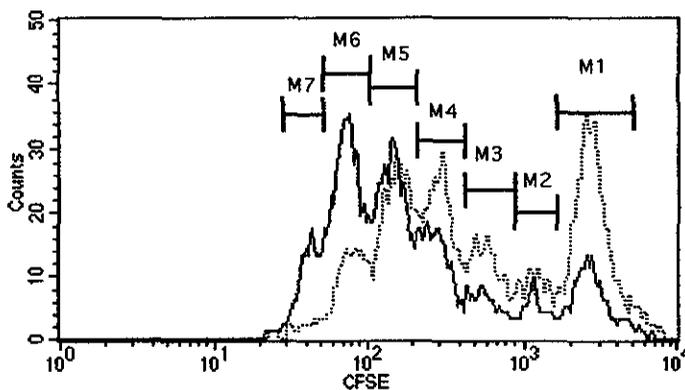


Figura 8. Patrón de división de células mononucleares estimuladas con PHA durante 96 h en presencia o ausencia de 1 μM de NaAsO₂. Línea sólida = control, sin NaAsO₂; línea punteada = células expuestas a 1 μM de NaAsO₂.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con la finalidad de obtener mayor información sobre el retraso del ciclo celular observado en presencia de As, analizamos los datos obtenidos de acuerdo a Lyons et al. (2000), para calcular el número de células originales ("células divididas") que entraron a división. De esta manera, encontramos un 44.7% de "células divididas" en el control, mientras que en presencia de As hay sólo un 26.1% de estas célula, lo que sugiere que el NaAsO₂ inhibe la entrada de las células a división.

Este ensayo se repitió con varios donadores más, y los datos fueron analizados de igual manera. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Como podemos observar en todos los casos la presencia de As disminuye el porcentaje de "células divididas".

Donador	% células divididas		% de disminución de células divididas
	0.0 μM [NaAsO ₂]	1.0 μM [NaAsO ₂]	
1	44.73	26.1	41.6
2	40.4	31.1	23.0
3	26.0	12.0	53.8
4.	46.1	37.5	18.7
5	26.6	17.8	33.0
6	47.3	31.3	33.8
7	69.7	61.1	12.0
8	68.2	51.8	24.1
X \pm SD	46.1 \pm 16.3	31.8 \pm 16.2	

Tabla 4. Porcentaje de células divididas expuestas y no expuestas a 1 μM de NaAsO₂ de 7 donadores. Se calculo el porcentaje de células divididas según la fórmula reportada por Lyons (2000) (ver mataterial y métodos).

Con estos resultados podemos concluir que el arsénico inhibe la entrada a división celular de las células en G₀ ("células divididas"), y además retrasa la división de las células que logran entrar a ciclo celular.

V.3 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para descartar la posibilidad de que la disminución de la proliferación pudiera ser causada por un efecto citotóxico del NaAsO₂, se determinó la viabilidad de las células a lo largo del experimento por el método de incorporación de yoduro de propidio. El yoduro de propidio es un colorante

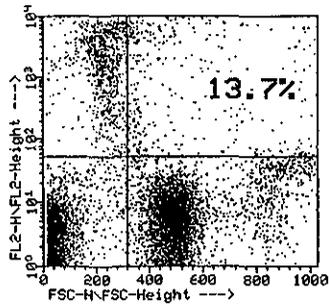
fluorescente derivado del fenantridíolo con doble carga positiva que se incorpora al DNA incrementando su fluorescencia una vez que se introduce a la célula. En las células vivas con membranas intactas el yoduro de propidio es excluido, y por lo tanto, son no fluorescentes. Las células son analizadas en un citofluorómetro y debido a que se analiza una gran cantidad de células la sensibilidad del análisis se incrementa.

Se determinó la viabilidad de las células expuestas a $1.0 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 durante 24 h sin estimular y 48 h después de estimularlas. Ambos ensayos se realizaron con células del mismo donador. Se analizó la viabilidad en una gráfica de tamaño (FSC-H) vs yoduro de propidio (FL2-H) de la población total de células, expuestas y no expuestas a NaAsO_2 . Como se puede observar en la Fig 9 (A), no hay diferencias en el porcentaje de células muertas (PI^+) expuestas a $1.0 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 (10%) con respecto a las células no expuestas a NaAsO_2 (13.7%) después de una incubación de 24 h previa a la estimulación con PHA. Por lo tanto podemos concluir que la dosis de $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 (que es la máxima concentración que utilizamos en nuestros ensayos) no tiene un efecto citotóxico en las PBMC. En la Fig 9 B se muestran las gráficas de las células estimuladas durante 48 h, donde se puede ver que no hay diferencias significativas en el porcentaje de células muertas (PI^+) en las células sin NaAsO_2 (49%) y las expuestas a $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 (53%). El porcentaje de células muertas entre el control y las células expuestas a arsénico no presenta diferencia. Por lo tanto $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 tampoco tiene efecto citotóxico en los linfocitos T estimulados con PHA.

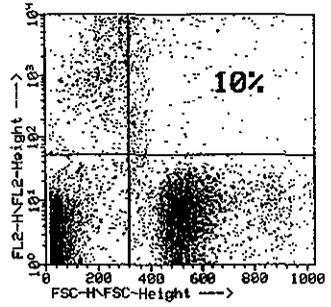
Este ensayo se realizó en 8 donadores más y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. El porcentaje de células muertas no varía significativamente en estos donadores ($P > 0.05$). En las células expuestas a $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 por 24 h no estimuladas va del 6% en el donador 2 hasta el 21% en el donador 5, y en las células no expuestas a NaAsO_2 por 24 h no estimuladas va del 8% del donador 1 al 20% en el donador 4. De igual forma no se observa una diferencia significativa en el porcentaje de células muertas estimuladas ($P > 0.05$) expuestas a $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 que va del 44% en el donador 1 al 58% en el donador 5, y el porcentaje de células muertas no expuestas a NaAsO_2 , que va del 45% en el donador 3 al 55.5% del donador 6. Con estos resultados se demuestra que la disminución de la proliferación de los linfocitos T humanos no es debida a un efecto citotóxico del NaAsO_2 .

A

Control

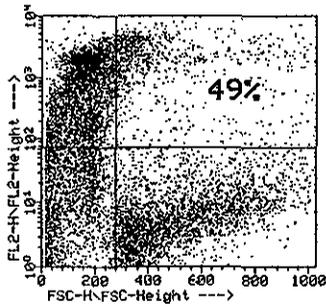


As



B

Control



As

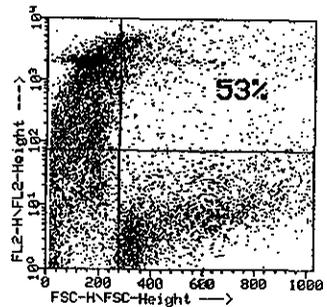


Figura 9. Determinación de la viabilidad de PBMC estimulados y no estimulados expuestos a $1\mu\text{M}$ de NaAsO_2 . PBMC fueron incubados durante 24 h en presencia o ausencia de $1\mu\text{M}$ de NaAsO_2 y la viabilidad se determinó por citofluorometría con yoduro de propidio (porcentaje de células muertas, IP^+) (A). Porcentaje de células muertas en cultivos de PBMC estimulados con PHA durante 48 h en presencia o ausencia de AS (B). FSC=tamaño, FL2=yoduro de propidio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Donador	24 h [NaAsO ₂]		(Δ)	48 h [NaAsO ₂]		(Δ)
	0.0 μM	1.0 μM		0.0 μM	1.0 μM	
1	8.0%	10.0%	+2.0	46.0%	44.0%	-2
2	6.0%	6.0%	0.0	41.0%	52.0%	+11
3	8.5%	11.0%	+2.5	45.0%	54.0%	+19
4	19.5%	17.0%	-2.5	45.0%	46.0%	+1
5	17.0%	22.0%	+5.0	45.0%	57.0%	+12
6	16.0%	19.0%	+3.0	55.5%	52.0%	-3.5
7	16.5%	14.5%	-2.0	49.0%	53.0%	+4
8	12.0%	13.0%	+1.0	50.0%	44.0%	-6
X±SD	12.9 ± 4.9	14.1 ± 5.2	+1.2	47.1 ± 4.4	50.3 ± 4.9	+3.2

Tabla 5. Porcentaje de células muertas (PI⁺).

V.4 DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN TEMPRANA

Una de las posibles causas de que el número de células expuestas a NaAsO₂ que entran a división celular sea menor que el número de las no expuestas podría deberse a que la activación de las células T se estuviera alterando por el As, por lo que decidimos determinar la expresión de CD69 y CD25, que son moléculas que se expresan en la superficie de los linfocitos T cuando son activados.

Se estimularon PBMC con PHA en presencia o ausencia de As durante 24 hrs. como se menciona en "Material y Métodos" y se hizo una inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-CD69, anti-CD25 y anti-CD3. El análisis se hizo a partir de gráficas de tamaño (FSC-H) vs CD3⁺ (FL3-H) donde se delimitó la región de las células CD3⁺, y esta región se analizó posteriormente en un histograma para determinar la expresión de CD25 y CD69 en las células CD3⁺. En la Fig 10 A se puede observar que la expresión de CD69 en las células CD3⁺ no varía en las células expuestas a 1 μM de NaAsO₂ con respecto al control, ya que no se alteran la media de intensidad de fluorescencia, (243.0 en el control y 246.0 en células expuestas a As) ni el porcentaje de células positivas para este marcador (51.2% en el control y 51.6% en las células expuestas a As). De igual forma en la Fig 10 B observamos que la expresión de CD25 en las células CD3⁺ expuestas a 1 μM de NaAsO₂ no se encuentra tampoco alterada siendo la media de la intensidad de fluorescencia en las células control de 134.0 y en las células expuestas a As de 140.0; en este caso el porcentaje de células CD3⁺ que expresan el marcador CD25 es de 92.5% y en las células expuestas a As es de 91.0%, es decir no se altera el porcentaje de células CD3⁺ CD25⁺ al exponerlas a 1 μM de NaAsO₂.

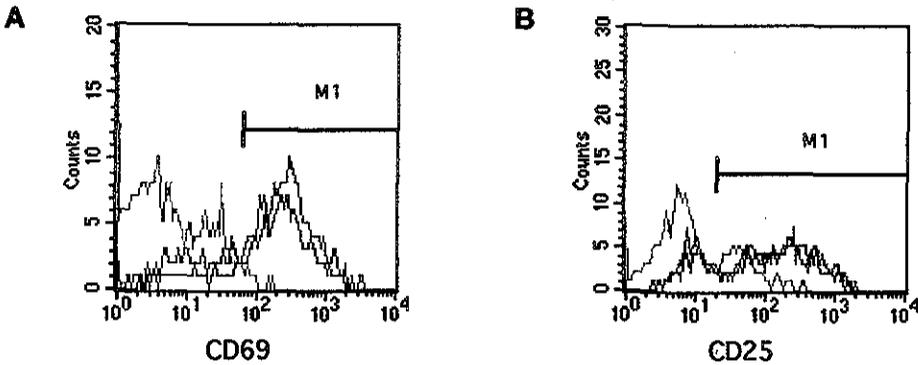


Figura 10. Determinación de la expresión de CD69 y CD25. PBMC se incuban con $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 por 24 h y posteriormente se estimularon con PHA en presencia o ausencia de $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 durante 24 h. Las células se marcaron con anticuerpos anti-CD69-FITC y anti-CD25-PE. Los histogramas muestran la expresión de: CD69 (A) y CD25 (B). Línea verde=isotipo, azul=control, roja= NaAsO_2 .

Estos ensayos se repitieron con varios donadores más y los resultados se muestran en la tabla 6; como se puede apreciar en ninguno de los donadores se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) en la expresión de los marcadores mencionados al ser expuestas las células a As.

Donador	%CD69 ⁺		%CD25	
	0 μM [NaAsO ₂]	1 μM [NaAsO ₂]	0 μM [NaAsO ₂]	1 μM [NaAsO ₂]
1	73.5	72.8	82.3	80.9
2	64.9	52.6	80.8	79.0
3	72.0	59.0	78.5	74.28
4	66.3	66.7	-	-

Tabla 6. Porcentaje de células positivas para CD69 y CD25.

V.5 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES CELULARES CD3, CD4 Y CD8

Una vez que determinamos la expresión de CD69 y CD25 no se alteran por NaAsO₂, pasamos a determinar la expresión de CD3, CD4 y CD8

Se incubaron los PBMC en presencia o ausencia de 1 μM de NaAsO₂ durante 24 h y posteriormente se estimularon durante 48 h más. Se recuperaron las células y se hizo una inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. Se hizo un histograma para analizar la intensidad de la fluorescencia de los marcadores CD4 y CD8. El análisis se hizo a partir de una región (R1) donde se encuentran las células blásticas, que se delimitó en una gráfica de tamaño (FSC-H) vs. granularidad (SSC-H), y posteriormente se analizó la intensidad de la fluorescencia en un histograma (Fig 11), donde la región M1 delimita a las células positivas para los marcadores CD3, CD4 o CD8.

Como se puede ver en la Fig 11 (A) no existen diferencias en la expresión del CD3 entre las células control que tienen una media de intensidad de fluorescencia de 38.9 y en las células expuestas a NaAsO₂ la media de intensidad de fluorescencia es de 36.2. La expresión de la molécula CD3 por lo tanto no está siendo alterada en las células expuestas a NaAsO₂.

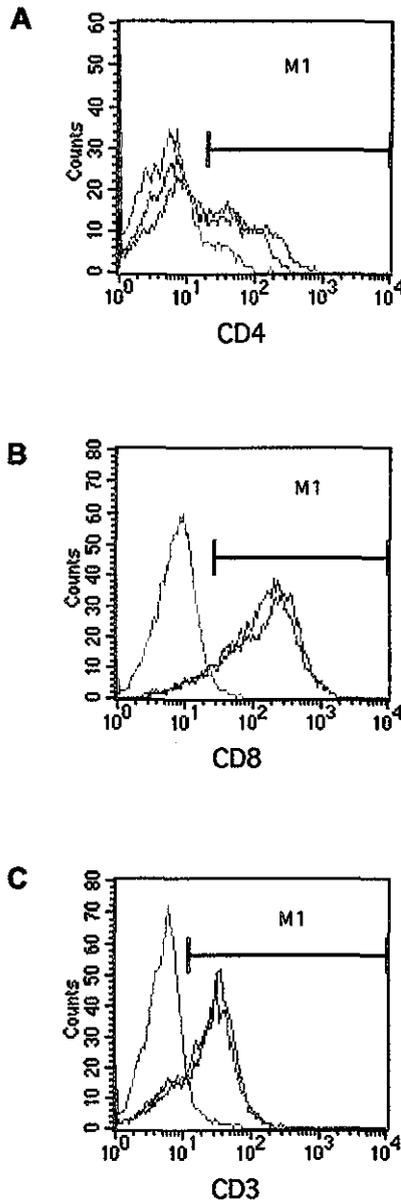


Figura 11. Determinación de la expresión de CD3, CD4 y CD8. PBMC se incubaron con 1 μM de NaAsO_2 por 24 h y posteriormente se estimularon con PHA en presencia o ausencia de 1 μM de NaAsO_2 durante 48 h. Las células se marcaron con anticuerpos anti-CD3-FITC, anti-CD8-Cy-5 y anti-CD4-PE. Los histogramas muestran la expresión de: CD4 (A) y CD8 (B) y CD3 (C). Línea verde=isotipo, azul=control, roja= NaAsO_2 .

Analizamos la expresión de CD3 en varios donadores más y como se puede observar en la tabla 7 no hay diferencias en la media de la intensidad de fluorescencia en las células de los diferentes donadores, expuestas y no expuestas a 1 μM de NaAsO_2 ($P>0.05$). En otras palabras, el As a esta molaridad no altera la expresión de la molécula CD3.

DONADOR	Media de la intensidad de fluorescencia		(Δ)
	0 μM [NaAsO_2]	1 μM [NaAsO_2]	
1	12.8	11.0	14.0
2	30.2	29.1	3.6
3	38.5	36.7	4.6
4	44.2	43.1	2.4

Tabla 7. Media de la intensidad de fluorescencia de CD3 en células expuestas y no expuestas a 1.0 μM de NaAsO_2 .

Como se puede observar en la Fig 11 (B) la expresión de CD8 en las células expuestas a 1 μM de NaAsO_2 disminuye ya que la media de la intensidad de fluorescencia de las células no expuestas a As es de 248 mientras que en presencia de As la media es de 219. Es decir hay un 11.7% de disminución en la expresión del marcador CD8. En la tabla 8 se muestra el análisis de la expresión de CD8 en tres donadores más. En todos los donadores analizados encontramos una disminución en la expresión de CD8, sin embargo esta disminución no es significativa ($P>0.05$).

Donador	Media de la intensidad de fluorescencia		(Δ)
	0 μM [NaAsO_2]	1 μM [NaAsO_2]	
1	416.6	388.7	6.7
2	97.5	57.3	41.2
3	148	123.9	16.3

Tabla 8. Media de la intensidad de fluorescencia de CD8 en células expuestas y no expuestas a 1.0 μM de NaAsO_2 .

En la Fig 11 (C) se muestra la expresión de la molécula CD4 en las células no expuestas y expuestas a 1 μM de NaAsO_2 . Como se puede observar la expresión de CD4 en las células expuestas a NaAsO_2 se encuentra disminuida ya que la media de fluorescencia en las células control es de 97.4 y en las células expuestas es de 64.7, es decir hay una disminución del 34.3% en la expresión de este marcador.

El ensayo se hizo con tres donadores más y los resultados se muestran en la tabla 9; en esta tabla podemos ver que en todos los donadores hay una disminución en la expresión de CD4,

sin embargo esta diferencia en la expresión de CD4 no es estadísticamente significativa ($P > 0.05$), por lo tanto demostramos que el NaAsO_2 no altera la expresión de CD4.

Donador	Media de la intensidad de fluorescencia		(Δ)
	0 μM [NaAsO_2]	1 μM [NaAsO_2]	
1	49.3	43.9	11.0
2	98.9	72.8	26.4
3	49.1	44.1	10.2

Tabla 9. Media de intensidad de fluorescencia de CD4 en células expuestas y no expuestas a 1.0 μM de NaAsO_2 .

V.6 DETERMINACIÓN DE IL-2 INTRACELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En estudios previos se cuantificó la secreción de la IL-2 de células T expuestas a NaAsO_2 y se encontró disminuida. Por otro lado, se ha determinado la expresión del gen de la IL-2 en células T humanas tratadas con NaAsO_2 a concentraciones similares a las usadas por nosotros y se encontró que no existe alteración en la expresión del gen (Vega 1998). También se sabe que el arsénico altera la polimerización de los microtúbulos (Ramírez 1997), lo cual podría alterar el transporte intracelular de las proteínas.

En base a estos datos previos nosotros propusimos la hipótesis de que el arsénico probablemente estuviera interfiriendo con la secreción de la linfocina y no con su síntesis, por lo que decidimos determinar la IL-2 dentro de las células T tratadas con NaAsO_2 por medio de la técnica de FACS, ya que esta técnica es específica y sensible.

Se estimularon PBMC con PHA en presencia o ausencia de As, como se explicó anteriormente y al término de la incubación, se recuperaron las células y se marcaron con anticuerpos anti-CD3 y anti-IL-2, por medio de la técnica descrita en materiales y métodos. Se analizó el porcentaje de células $\text{CD3}^+ \text{IL-2}^+$ en cada una de las muestras. Para esto se hicieron primero gráficas de tamaño (FSC-H) vs granularidad (SSC-H) de la población total; en estas gráficas se delimitó una región (R1) que comprende a los linfocitos T (blastos) y de esta región se hizo una gráfica de CD3 (FL1) vs IL-2 (FL2); de estas gráficas se obtuvieron los porcentajes de células $\text{CD3}^+ \text{IL-2}^+$.

En la Fig 12 A se puede ver la población total de células en gráficas de FSC-H vs SSC-H y la región donde están comprendidos los blastos expuestos a diferentes concentraciones de NaAsO_2 .

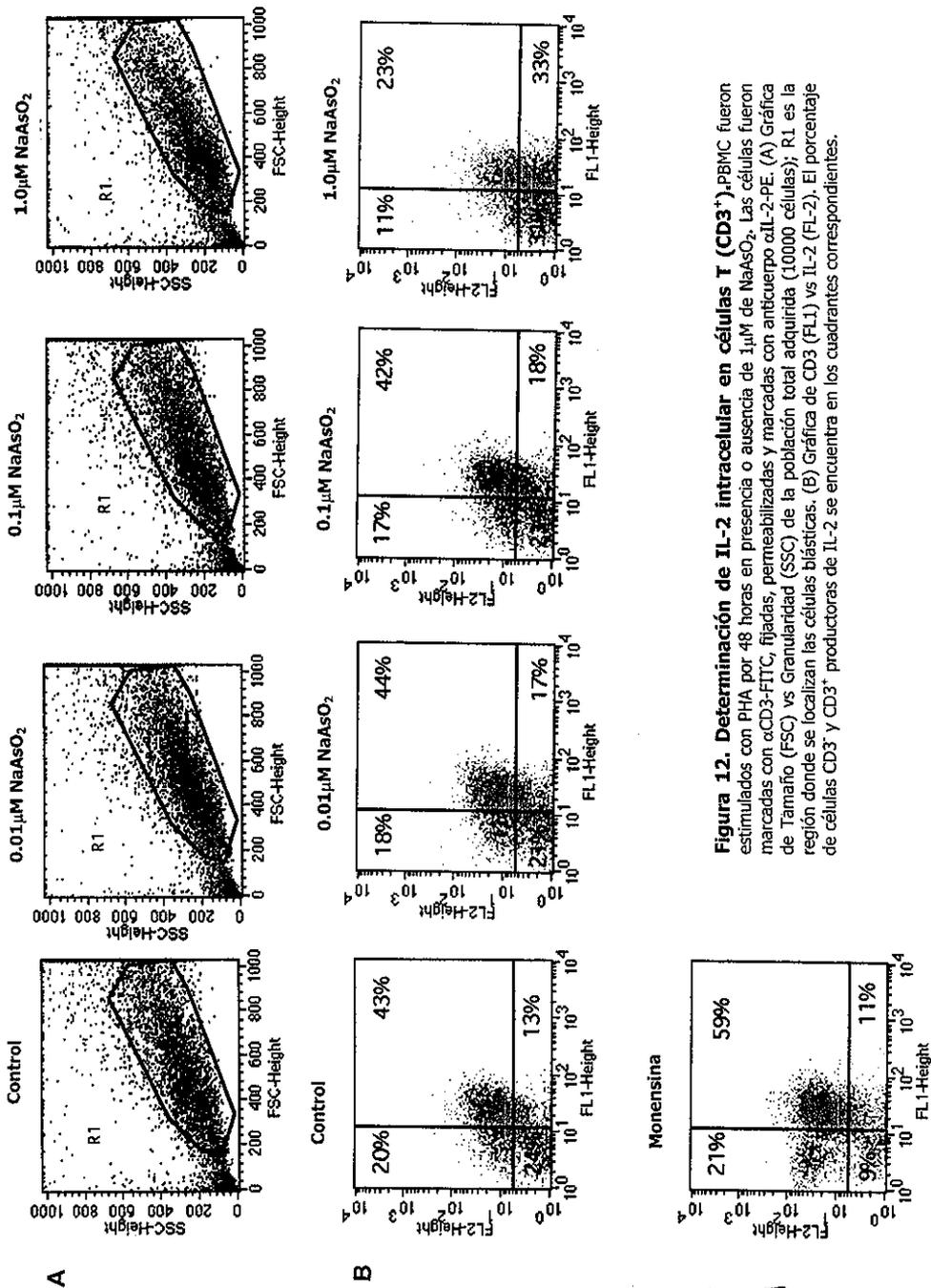


Figura 12. Determinación de IL-2 intracelular en células T (CD3⁺), PBMC fueron estimulados con PHA por 48 horas en presencia o ausencia de 1 μM de NaAsO₂. Las células fueron marcadas con αCD3 -FITC, fijadas, permeabilizadas y marcadas con anticuerpo $\alpha\text{IL-2}$ -PE. (A) Gráfica de Tamaño (FSC) vs Granularidad (SSC) de la población total adquirida (10000 células); R1 es la región donde se localizan las células blásticas. (B) Gráfica de CD3 (FL1) vs IL-2 (FL-2). El porcentaje de células CD3⁺ y CD3⁺ productoras de IL-2 se encuentra en los cuadrantes correspondientes.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Como se puede observar el patrón de tamaño y granularidad no está alterado en ninguno de los casos y la región G1 se mantiene inalterada en todas las muestras.

En la Fig 12 B tenemos las gráficas de CD3⁺ e IL-2⁺ de la región R1, donde podemos ver el porcentaje de células CD3⁺ IL-2⁺. En las células expuestas a 0.01 y 0.1 μM de NaAsO₂ el porcentaje de células positivas para CD3 e IL-2 no varió significativamente con respecto a las células no expuestas a NaAsO₂ (en el donador 7 es del 43% en el control y del 44% y 42% en las células expuestas a 0.01 μM y 0.1 μM de NaAsO₂, respectivamente). Sin embargo en las células expuestas a 1.0 μM de NaAsO₂ hay una disminución significativa en el porcentaje de células CD3⁺ IL-2⁺ que va del 43% en el control al 23% en las células tratadas con NaAsO₂. También se observa una disminución en el porcentaje de células CD3⁺ IL-2⁺, que va del 20% en las células no expuestas al 11% en las células expuestas a NaAsO₂ (datos no mostrados). Estos resultados muestran claramente que hay una disminución de células CD3⁺ productoras de IL-2 tratadas con 1.0 μM de NaAsO₂, lo cual es contrario a lo que esperábamos, ya que nuestra hipótesis inicial proponía que la IL-2 se estaba acumulando dentro de la célula.

Los ensayos se repitieron en 7 donadores más para corroborar la reproducibilidad del ensayo. En la tabla 10 se pueden ver los porcentajes de células CD3⁺ IL-2⁺ y CD3⁻ IL-2⁺, expuestas y no expuestas a 1 μM de NaAsO₂, de cada uno de estos donadores.

Donador	% de células CD3 ⁺ IL-2 ⁺ ()	
	0 μM [NaAsO ₂]	1 μM [NaAsO ₂]
1	25	11
2	21	4
3	23	3
4	16	5
5	19	7
6	36	26
7	12	9

Tabla 10. Porcentaje de células CD3⁺ IL-2⁺ en células tratadas y no tratadas con NaAsO₂

En todos los casos la IL-2 intracelular disminuye significativamente ($P < 0.05$) en las células CD3⁺ expuestas a 1 μM de NaAsO₂. Los resultados fueron reproducibles en todos los donadores, con pequeñas diferencias entre donadores en los porcentajes de células positivas para IL-2 y CD3.

Debido a que nuestra hipótesis era que el arsénico interfería con la secreción de la IL-2, incluimos un control de células no expuestas a NaAsO₂ pero incubadas con monensina; este compuesto es un ionóforo que impide el transporte intracelular de las proteínas y la usamos como un control positivo de la acumulación de la linfocina dentro de la célula.

El porcentaje de células CD3⁺ IL-2⁺ se incrementa en las muestras tratadas con monensina, de 43% en el control a 59.1%. Nuestro control positivo para la acumulación de la linfocina actuó como esperábamos acumulando a la proteína dentro de la célula.

V.7 EL ARSÉNICO NO IMPIDE EL PEGADO DE LOS ANTICUERPOS AL CD3 Y A LA IL-2

El arsénico inorgánico en su forma trivalente se une a los grupos -SH disponibles de cualquier proteína, por lo que existía la posibilidad de que el NaAsO₂ estuviera impidiendo que los anticuerpos utilizados para determinar la expresión de CD3 e IL-2 se unieran a sus epítopes. Por esta razón decidimos realizar un ensayo para verificar que la disminución de la IL-2 intracelular que observamos fuera debida al efecto del As sobre los linfocitos T y no a que el As estuviera impidiendo el pegado de los anticuerpos.

Para este ensayo los PBMC se mantuvieron 24 h en cultivo expuestos y no expuestos a 1 μM de NaAsO₂ durante 24 h y posteriormente todas se estimularon con PHA durante 48 h más. Por otra parte a células estimuladas durante 46 h, en ausencia de As, se les agregó 1 μM de NaAsO₂ y se incubaron dos horas más. En el caso de que el As se uniera al CD3 y a la IL-2 e impidiera la unión de los anticuerpos (anti-CD3 y anti-IL-2), 2 horas serían suficientes para que el arsénico se incorporara a las células y se uniera a las proteínas con grupos -SH disponibles. Un grupo más de células fueron expuestas a 1 μM de NaAsO₂ durante la incubación con los anticuerpos únicamente. Las células se recuperaron y se marcaron con los anticuerpos correspondientes como se mencionó en "Material y Métodos".

En la Fig 13 A tenemos a las células expuestas a As únicamente durante la incubación con los anticuerpos, y como podemos observar no existen diferencias en el porcentaje de células CD3⁺ IL-2⁺ de las células no expuestas (29%) y las células expuestas a NaAsO₂ (31.5%) por lo que el As no está impidiendo el pegado de los anticuerpos. En la Fig 13 B observamos que

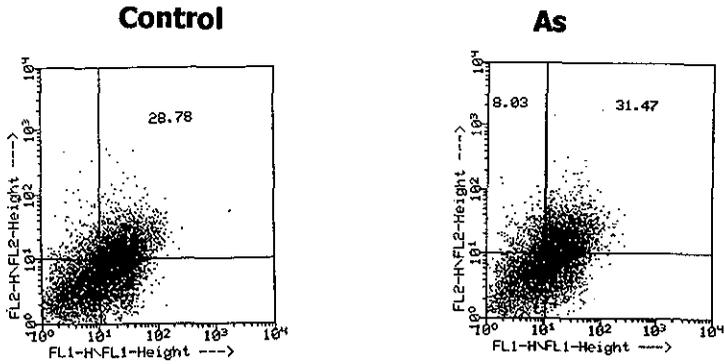
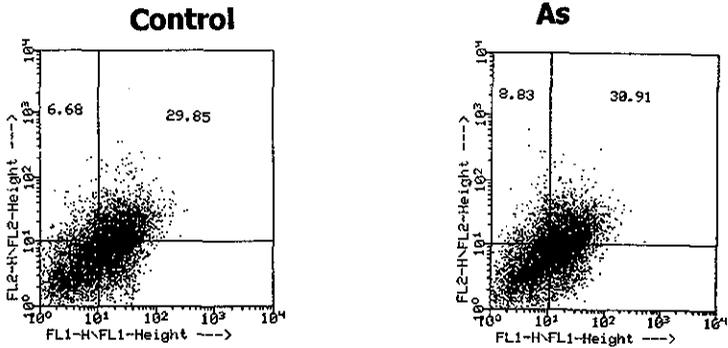
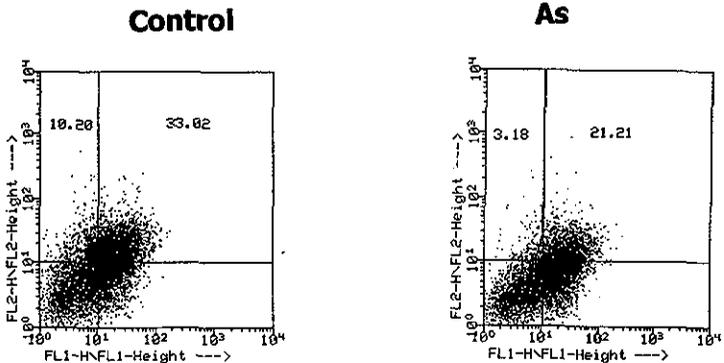
A**B****C**

Figura 13. El NaAsO₂ no impide el pegado de los anticuerpos α CD3 y α IL-2. PBMC se estimularon durante 48 horas en presencia o ausencia de As. Se marcaron con anticuerpos α CD3, se permeabilizaron y se marcaron con α IL-2. (A) Células incubadas con los anticuerpos en presencia de As. (B) Células incubadas con As 2 horas antes de marcarlas con anticuerpos. (C) Células incubadas con As 48 horas antes de marcarlas con anticuerpos. FL1=CD3, FL2=IL-2.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

en las células expuestas durante 2 h a As no presentan una diferencia significativa en el porcentaje de células CD3⁺ IL2⁺ (30.9%) con respecto a las células no expuestas a As (30.9%). Finalmente en la Fig 13 C se muestra a las células expuestas 48 h a As y su control de células no expuestas a As; aquí podemos observar la disminución del porcentaje de células CD3⁺ IL-2⁺ en las células expuestas a NaAsO₂ (21.2%) con respecto al control (33.0%), como se había observado en experimentos previos. Estos experimentos demuestran que la disminución en el porcentaje de células CD3⁺ IL-2⁺ no se debe a una inhibición del pegado de los anticuerpos por el As sino a un efecto del arsénico sobre las células productoras de IL-2.

V.8 CUANTIFICACIÓN DE IL-2 EN LOS SOBRENADANTES

Una vez que determinamos las células productoras de IL-2, el siguiente ensayo fue cuantificar esta linfocina en los sobrenadantes de los cultivos de células expuestas y no expuestas a NaAsO₂. Se recuperaron los sobrenadantes de las células estimuladas por 48 h con PHA (sobrenadantes de las mismas células que utilizamos para determinar la IL-2 intracelular) y se cuantificó la IL-2 por bioensayo con células CTLL-2 como se mencionó anteriormente. En la tabla 11 se muestran las U/ml de IL-2 en los sobrenadantes de las células expuestas a 1 μM de NaAsO₂ y de los controles de tres diferentes donadores.

Donador	IL-2 [U/ml]	
	0 [NaAsO ₂]	1μM [NaAsO ₂]
1	7.02± 2.1	6.29±1.2
2	4.0± 0.5	5.51± 1.1
3	13.9±1.6	16.8±2.8

Tabla 11. IL-2 [U/ml] en sobrenadantes de células no expuestas y expuestas a 1 μM de NaAsO₂ a las 48 h post-estimulación

Como se puede observar en la tabla 11, la cantidad de IL-2 en el sobrenadante de los cultivos de células expuestas a NaAsO₂ no varía con respecto al control (P>0.05). Estos resultados son contrarios a lo observado anteriormente (Vega 1998). La diferencia entre lo reportado anteriormente y nuestros resultados es el tiempo en que se cuantificó la IL-2. En los experimentos previos cuantificaron la IL-2 en los sobrenadantes 24 h después de estimular a las células con PHA, mientras que nosotros la cuantificamos 48 h después de estimular a las células. Por lo tanto, decidimos cuantificar la IL-2 cada 24 h hasta el término del experimento (72 horas), tanto la IL-2 intracelular como la secreción de IL-2.

Expusimos PBMC 24 horas a 1 μM de NaAsO_2 y posteriormente estimulamos a estas células con PHA. Se determinó la IL-2 intracelular en estas células a las 24, 48 y 72 h después de haberlas estimulado. Los resultados se muestran en la tabla 12. Como se puede observar en las células no expuestas a As el porcentaje de células $\text{CD3}^+ \text{IL-2}^+$ se incrementa paulatinamente hasta llegar un máximo a las 72 horas, mientras que las células expuestas a As presentan un comportamiento similar pero el porcentaje de células $\text{CD3}^+ \text{IL-2}^+$ es menor, es decir hay una menor cantidad de células productoras de IL-2 en las células expuestas a 1 μM de NaAsO_2 .

Tiempo (h)	% células $\text{CD3}^+ \text{IL-2}^+$	
	0 μM [NaAsO_2]	1 μM [NaAsO_2]
24	18.5	8.0
48	37.7	24.0
72	73.0	57.1

Tabla 12. Porcentaje de células $\text{CD3}^+ \text{IL-2}^+$ de cultivos de PBMC estimulados con PHA durante 24, 48 y 72 h

Paralelamente cuantificamos la IL-2 [U/ml] en los sobrenadantes de los mismos cultivos. Como se puede observar en la Fig 14 la producción de IL-2 tiene su máximo entre las 24 y 48 h, disminuyendo significativamente a las 72 h, mientras que en las células expuestas a As la IL-2 en los sobrenadantes a las 24 h no es detectable, sin embargo a las 48 y 72 h de estimulación la producción y secreción de IL-2 en estas células se incrementa teniendo su pico máximo a las 72 h.

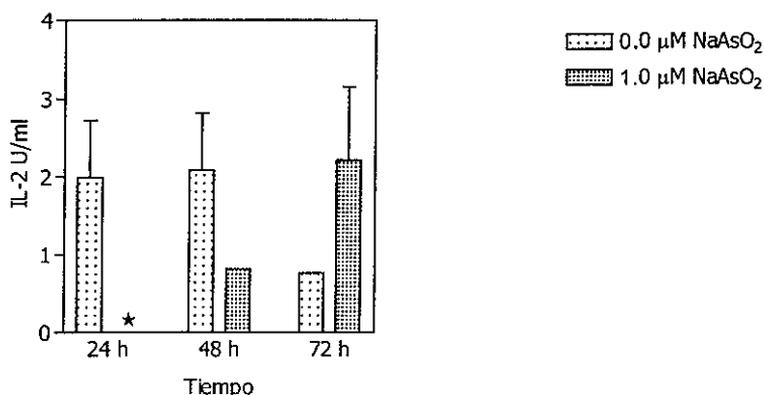


Figura 14. Determinación de IL-2 en sobrenadantes en presencia de As. Se recuperaron los sobrenadantes de cultivos celulares de PBMC estimulados con PHA durante 24, 48 y 72 h en presencia o ausencia de 1 μM de NaAsO_2 y se cuantificó la IL-2 por bioensayo con células CTL-2. * ND (≤ 0.03 U/ml).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Con estos resultados llegamos a la conclusión de que debido a que hay un retraso en la proliferación de los linfocitos T, como consecuencia hay una menor cantidad de células productoras de IL-2, y por lo tanto menor cantidad de IL-2. Sin embargo, la producción de IL-2 se va recuperando con el paso del tiempo ya que la cantidad de células productoras de IL-2 se incrementa.

Estos ensayos se repitieron con cuatro donadores más (datos no mostrados). En todos los casos se observa que la producción de IL-2 se encuentra retrasada. Con estos resultados llegamos a la conclusión de que la síntesis de la proteína no está siendo alterada, sino que la disminución en la producción de la IL-2 es por el retraso en la proliferación de los linfocitos T ya que si la síntesis de esta proteína estuviera siendo afectada específicamente por el As como pensamos inicialmente.

V.9 CICLO CELULAR

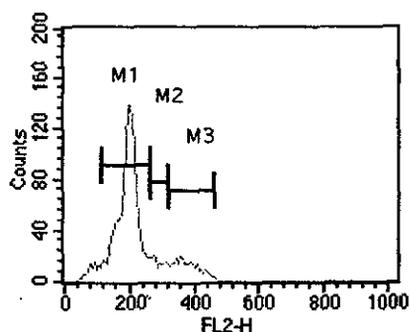
Por los resultados obtenidos al evaluar la proliferación de los linfocitos T y las cinéticas de producción de IL-2, parecían indicar que el ciclo celular de los linfocitos T estaba retrasado; sin embargo, con los ensayos realizados hasta este momento no podíamos afirmarlo, por lo que evaluamos el ciclo celular por la técnica de citofluorometría por incorporación de yoduro de propidio.

Para realizar este ensayo se incubaron PBMC con As durante 24 h y se estimularon posteriormente durante 72 h. Al término de la incubación se recuperaron las células y se tiñeron con yoduro de propidio, para ser analizadas posteriormente en el citofluorómetro.

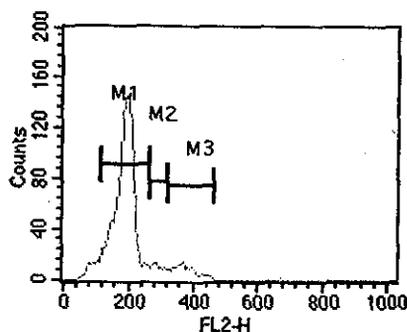
Las células se analizaron en una gráfica de amplitud (FL2-W) vs área bajo la curva (FL2-A) de la fluorescencia detectada. Se seleccionó la región G1, con la finalidad de descartar los restos celulares así como los posibles agregados celulares que nos pudieran dar la fluorescencia de células en fase G2/M. De la región G1 se hizo un histograma para yoduro de propidio (FL2). En este histograma el pico M1 corresponde a las células en fase G₁/G₀ del ciclo celular, el pico M2 corresponde a las células en fase S y las células en el pico correspondiente a M3 son las que se encuentran en fase G2/M del ciclo celular, es decir son las células que están entrando a división celular y por lo tanto tienen el doble de contenido de DNA; la media de fluorescencia de este pico M3 corresponde al doble de la media de fluorescencia del pico M1 donde las células están en fase G₀ (Fig 15).

Los porcentajes de las regiones M1, M2 y M3 se muestran en la tabla 13, como se puede observar en los cultivos que no se expusieron a As el pico M3 que corresponde a la fase G2/M y

contiene el 12.5% de las células, mientras que los cultivos expuestos a $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 el pico M3 contiene el 6.4%, es decir hay menos células en división en las células expuestas a As. En el caso de la región M2 que corresponde a la fase S en las células expuestas a As tenemos un menor porcentaje con respecto al control. En la región M1 que corresponde a la fase G_0/G_1 , el porcentaje de células es mayor en las células expuestas a As, es decir menor número de células entraron a división celular cuando se expusieron a As. Con estos resultados confirmamos nuestras observaciones anteriores sobre el retraso en el ciclo celular. Por lo tanto podemos concluir que hay un retraso en el ciclo celular de las células T expuestas a $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 .



CONTROL



As

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 15. Evaluación del ciclo celular de células T expuestas a As. Se incubaron PBMC por 24 h en presencia o ausencia de $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 . Posteriormente se estimularon durante 72 horas. Las células fueron fijadas en etanol y marcadas con yoduro de propidio. (A) $0 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 (B) Células expuestas a $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 . FL2-H=yoduro de propidio.

Fases del ciclo celular	Porcentaje de células	
	0 μM [NaAsO ₂]	1 μM [NaAsO ₂]
G ₀ /G ₁	77.2	85.3
S	6.8	3.96
G ₂ /M	12.6	6.4

Tabla 13. Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular de células expuestas y no expuestas a 1 μM de NaAsO₂.

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El arsénico es un inmunotóxico que altera la inmunidad humoral y la inmunidad celular (Harrison y McCoy 2001; Gensebatt et al., 1992; Vega et al., 1999; Yoshida et al., 1986), sin embargo el mecanismo bioquímico de este efecto no ha sido bien caracterizado. En el presente trabajo demostramos que el NaAsO_2 retrasa el ciclo celular de los linfocitos T humanos estimulados con PHA y llegamos a la conclusión de que la alteración en la producción y secreción de IL-2 es debida a que: 1) el número de células que entran ciclo celular es menor en las células expuestas a As, 2) las células que entran a ciclo celular lo hacen más lentamente y como consecuencia se retrasa la síntesis y secreción de la IL-2 durante las primeras 48 h del cultivo, 3) 24 horas más tarde los linfocitos expuestos a NaAsO_2 tienen un incremento en la producción de IL-2.

Inicialmente nuestro objetivo fue determinar la causa de la disminución de la secreción de la IL-2 en linfocitos T humanos expuestos a NaAsO_2 , como una de las causas aparentes de la disminución en la proliferación de las células T, debido a que la IL-2 es la citocina que regula, principalmente, la proliferación de los linfocitos T. En estudios previos se reportó que el NaAsO_2 disminuye la secreción de IL-2 en linfocitos T humanos activados con PHA pero no altera la síntesis del RNAm de IL-2 (Vega, 1998). También se ha reportado que el NaAsO_2 provoca alteraciones en el citoesqueleto (Li y Broome, 1999; Li y Chou, 1992; Ramírez et al., 1997; Vega, 1995), por lo que propusimos la hipótesis de que el transporte intracelular de la IL-2 podría estar siendo alterado por el NaAsO_2 .

Comenzamos por reproducir los experimentos de proliferación por incorporación de [^3H]- timidina de los linfocitos T humanos en varios donadores. Encontramos que el NaAsO_2 disminuye la proliferación de forma dosis dependiente en las dosis probadas por nosotros (0.01, 0.1 y 1.0 μM). Resultados similares han sido reportados (Jha et al., 1992; Vega et al., 1999; Yu et al., 1998). En este estudio probamos concentraciones superiores a éstas (10 y 100 μM) pero la mortalidad de las células expuestas a estas dosis fue del 100% (datos no mostrados). Las concentraciones de As de 0.01, 0.1 y 1.0 μM que utilizamos en nuestros ensayos son dosis a las que están crónicamente expuestos grupos humanos en ciertas áreas geográficas como Taiwán, México, Chile, Argentina y la India (Hsu et al., 1997; Harrison y McCoy, 2001; Vahter et al., 1999).

En nuestros resultados observamos que hay diferencias de susceptibilidad entre los diferentes individuos así como diferencias de susceptibilidad intraindividual, es decir, aunque la tendencia a la disminución en la proliferación se da en todos los casos, el efecto es en diferente proporción. En estudios anteriores esta diferencia de susceptibilidad ya había sido observada (Vega,

1998) y puede ser debida a factores como el estilo de vida, la alimentación, el fondo genético, la exposición a contaminantes ambientales (Chiou et al., 1997; Hsu et al., 1997; Yu et al., 1992) y también podría explicarse por una diferencia en el metabolismo del arsénico en cada individuo (Chiou et al., 1997; Gebel, 2000; Vahter, 2000).

Una vez que verificamos la reproducibilidad de los ensayos de proliferación en nuestro laboratorio, tratamos de obtener más información de la disminución en la proliferación de los linfocitos T, para lo cual empleamos la técnica de CFSE, que nos permitió seguir la historia de división de las células estimuladas (Angulo y Fulcher 1998; Lyons et al., 2000). Con esta técnica pudimos determinar que el arsénico provoca un retraso en la proliferación, y aplicando el análisis descrito por Lyons (2000) encontramos que el NaAsO_2 causa que un porcentaje menor de células entren a división celular. Anteriormente se reportó alterada la cinética de proliferación en linfocitos T de humanos expuestos a As (Gonsebatt et al., 1992; Ostrosky-Wegman et al., 1991), determinada por métodos de citogenética. Por lo tanto concluimos que el NaAsO_2 a una concentración de $1.0 \mu\text{M}$ retarda la proliferación de los linfocitos T humanos estimulados con PHA.

También confirmamos que los efectos sobre la proliferación de los linfocitos T no es debida a un efecto citotóxico del arsénico, por medio de citofluorometría. Encontramos que no existen diferencias significativas en el porcentaje de células muertas entre los cultivos celulares expuestos y no expuestos a As. Nuestros resultados concuerdan con los reportados anteriormente (Salazar, 1998; Vega, 1998), sólo que el parámetro de viabilidad en estos casos fue determinado por diferentes técnicas.

Debido a la importancia que tienen las moléculas CD4 y CD8 en la activación de los linfocitos T evaluamos la expresión de estos marcadores en células T expuestas a As. Existen pocos reportes sobre el efecto que tiene el As sobre estos marcadores, sin embargo hay trabajos donde se ha reportado el efecto de otros metales sobre CD4 y CD8; por ejemplo, se sabe que el citrato férrico suprime la proliferación de linfocitos estimulados con PHA que puede ser una consecuencia de la reducción de la expresión de las moléculas CD4 y CD8 y la modulación negativa de la actividad de los complejos CD4-Ick de PMBC en reposo por el citrato férrico (Arosa y Sousa, 1995). En nuestro trabajo encontramos que la exposición a $1 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 no reduce significativamente la expresión de CD4, CD8 ni la expresión de CD3. Nuestros resultados los obtuvimos de células T expuestas a As y estimuladas con PHA durante 48 h. Estos resultados concuerdan con los resultados de reportados anteriormente (Vega, 1998).

A nivel molecular, el arsénico causa toxicidad celular por múltiples mecanismos, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno y la alteración en la actividad de enzimas claves involucradas en la proliferación celular (Namgung y Xia, 2001). El estrés oxidativo tiene el potencial de modificar la función de las biomoléculas celulares, incluyendo el DNA. El daño al DNA y la mutación en genes que controlan el crecimiento celular puede dirigir a la disfunción/desregulación celular y a la transformación celular (Pahlavani y Vargas, 2000). De igual manera, el arsénico podría tener como blanco de su efecto las moléculas involucradas en la activación de las células T (Hossain et al 2000). También se ha demostrado que la exposición por 2 meses a 6 μM de NaAsO_2 induce una desregulación de las proteínas involucradas en la señalización proliferativa en fibroblastos C3H 10T1/2 (Trouba et al., 2000). Estas evidencias nos hicieron pensar que la activación de las células T podría estar alterada por el As, lo cual explicaría la disminución en la proliferación de estas células por lo que determinamos la expresión de los marcadores de activación temprana CD25 y CD69. El marcador de activación CD69, es una molécula coestimuladora en la proliferación de los linfocitos T que se expresa tempranamente después de disparar la activación vía el CD2 o el TCR (Rutella et al., 1998). Los linfocitos de sangre periférica tienen una pequeña expresión basal, pero la adición de un estímulo da como resultado la inducción de CD69 en la superficie celular (Santis et al., 1995). En nuestros experimentos encontramos que la expresión de este marcador no se altera en las células expuestas a 1 μM de NaAsO_2 . Aunque la expresión de este marcador no necesariamente indica que la célula activada progrese a ciclo celular y prolifere (López-Cabrera et al., 1993), con los resultados obtenidos podemos decir que la activación de los linfocitos T humanos expuestos a As no está alterada.

Por otro lado determinamos la expresión de CD25 (cadena α del receptor de IL-2) y encontramos que no se altera en las células T expuestas a 1.0 μM de NaAsO_2 . La mayoría de los linfocitos de sangre periférica están en un estado de reposo (G_0) y son CD25⁻ (Abbas, 2000). La estimulación de los linfocitos T con mitógeno o su antígeno induce el progreso del ciclo celular de G_0 a G_1 y a la expresión de CD25, la cual se asocia no covalentemente con las subunidades β y γ para formar el receptor de alta afinidad de IL-2 (Caspar-Bauguil et al., 1998). Esta molécula es importante ya que se sabe que la expresión de este receptor en la superficie celular es crítica para la respuesta de las células a la IL-2 (Hodge et al., 2000). Nuestros resultados están acorde a lo reportado anteriormente en linfocitos T humanos (Vega, 1999). Sin embargo, se ha reportado que compuestos de As alteran la expresión de CD25 e inhibe la proliferación de células T murinas (Burns y Munson, 1993); también existen reportes donde el arsenito inhibe la expresión de CD25 en linfocitos T humanos de pacientes con la enfermedad de Bowen (Yu et al., 1998). Las diferencias entre nuestros resultados y los reportados pueden deberse en el primer caso a que se trata de células murinas, y en el segundo caso, a que las células provenían de pacientes con un

padecimiento bien determinado lo cual por sí mismo puede estar alterando la expresión de este marcador (Yu et al., 1998). En nuestro caso en donadores sanos podemos decir que la inhibición de la proliferación en los linfocitos T expuestos a As no es debida a una disminución en la expresión del receptor de IL-2. Al no estar alterada la expresión de CD25 ni de CD69 podemos decir que los eventos tempranos y tardíos (Abbas et al., 2000) de activación de los linfocitos T no se alteran por la exposición a As.

La IL-2 es el principal factor de crecimiento de las células T. La producción de esta proteína puede ser afectada por algunos metales como Ni y Zn que inducen la secreción de elevados niveles de IL-2 de linfocitos de bazo de ratones en cultivo, y un aumento en la expresión del receptor de IL-2. El Ni tiene el mismo efecto en PBMC de humanos (Karttunen et al., 1988). El abuso de drogas modula la inmunobiología de la IL-2; la marihuana inhibe tanto la producción de IL-2 y la expresión de su receptor; mientras que el etanol inhibe la respuesta a IL-2 (Jerrells y Pretz, 1994). La cocaína incrementa la producción de la IL-2 (Wang et al., 1994). Los pesticidas han mostrado tanto un incremento como un decremento en la producción de IL-2. Estos estudios han diferido en la clase de pesticida usado, la ruta de administración y la especie animal probada. Se ha demostrado que la exposición a solventes industriales como benceno y tolueno y 2-methoxyethanol inhiben la producción de IL-2 (McCabe, 1997).

Nuestros resultados demuestran que hay una disminución de IL-2 intracelular (determinada como células CD3+ IL-2+) en las células expuestas a 1.0 μ M de NaAsO₂. Sin embargo, estos resultados son opuestos a lo que esperábamos, pues de acuerdo con nuestra hipótesis inicial, donde planteamos que era probable encontrar alterado el transporte intracelular en las células tratadas con arsénico, lo que estaría provocando la acumulación de la linfocina en el interior de las células expuestas a As. Sin embargo nuestros resultados concuerdan con los estudios hechos con otros metales como Cu, Cd y Mn, en los que también se observó disminución en la producción de IL-2 por PBMC estimulados con PHA (Theocaris et al 1991).

Anteriormente se encontró que la secreción de IL-2 en células T expuestas a As está alterada (Vega 1998); estos resultados se obtuvieron de cultivos de células mononucleares estimuladas con PHA durante 24 h. Por nuestra parte, hicimos la cuantificación de IL-2 en los sobrenadantes de células mononucleares expuestas a As estimuladas durante 48 horas y encontramos que la cantidad de IL-2 se incrementa ligeramente con respecto a las células control. Esta diferencia en los resultados nos llevó a pensar que las células expuestas a As se estaban recuperando conforme se incrementa el tiempo de cultivo y decidimos evaluar la IL-2 intracelular y en los sobrenadantes de los cultivos de células expuestas a As a las 24, 48 y 72 h.

Al hacer esta cinética en la evaluación de IL-2 intracelular y secretada, encontramos que efectivamente, las células se recuperan al incrementarse el tiempo de cultivo y el pico máximo de síntesis y secreción de la linfocina se encuentra desplazado en el tiempo y la cantidad de IL-2 sintetizada y secretada es ligeramente menor en las células expuestas a As, sin embargo no deja de sintetizarse.

En trabajos previos se demostró en diferentes líneas celulares que el As altera la progresión del ciclo celular (Huang et al., 2000; Park et al., 2001; Salazar et al., 1997). El arsenito induce aductos oxidativos en el DNA y entrecruzamientos DNA-proteína en células de leucemia humana (HL60) y células de ovario de hamster chino (CHO-K1) tratadas con 2 μ M de NaAsO₂. Por otro lado, se ha demostrado que el arsénico causa una elevación de los niveles de radicales superóxido en células de tejido muscular humano, causando daño oxidativo al DNA. Sin embargo en el endotelio aórtico de bovino y células CHO, se demostró que el daño producido en el DNA fue por un incremento en la producción de óxido nítrico (Wang et al., 2001).

Los datos obtenidos en nuestro trabajo, sobre la cinética de proliferación de los linfocitos T expuestos a As parecían indicar que el ciclo celular se encuentra retrasado. Para confirmar esto evaluamos el ciclo celular por citofluorometría, encontrándose retrasado por el As. Nuestros datos correlacionan con datos reportados sobre la alteración del ciclo celular en diferentes tipos celulares (Park et al., 2001; Wang et al., 2001). Estas alteraciones en el ciclo celular causadas por el NaAsO₂ podrían deberse a que el As genera especies reactivas de oxígeno que están involucradas en el daño a DNA, proliferación celular y apoptosis (Wang et al., 2001).

El arsénico, específicamente en su forma trivalente, es un metaloide biorreactivo que se une covalentemente a grupos sulfhidrilo, preferencialmente a ditioles vecinos (Bogdan et al., 1994; Healy et al., 1998) por lo que puede unirse a cualquier molécula celular que contenga grupos tío; por esta razón el efecto del As va a ser inespecífico y generalizado en la célula. Así tenemos que el arsénico a nivel celular y molecular tiene variados efectos como estrés oxidativo (Harrison, 2001; Hu et al., 1998; Lynn et al., 1999), altera la concentración de GSH (Li y Chou, 1992), modula la metilación del DNA (Mass y Wang, 1997), altera la fosforilación de proteínas involucradas en la proliferación (Trouba et al 2000), altera la transcripción de diferentes proteínas relacionadas con estrés oxidativo, altera la conformación del citoesqueleto (Li y Chou, 1992; Ramírez et al., 1997) lo cual da como resultado la alteración de la proliferación de los diferentes tipos celulares que han sido expuestos *in vitro* a As.

Con la demostración de que el NaAsO_2 retrasa el ciclo celular de los linfocitos T humanos llegamos a la conclusión de que la alteración en la producción y secreción de IL-2 es debida a que: 1) el número de células que entran ciclo celular es menor en las células expuestas a As, 2) las células que entran a ciclo celular lo hacen más lentamente y como consecuencia de ésto se retrasa la síntesis y secreción de la IL-2 durante las primeras 48 h del cultivo, sin embargo 3) 24 h más tarde los linfocitos expuestos a NaAsO_2 tienen un incremento en la producción de IL-2.

VII. REFERENCIAS

1. Acuto, O., D. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annual Review of Immunology*. 18:165-184.
2. Abbas A.K., A.H. Lichtman, J.S. Pober. 2000. *Cellular and molecular immunology*, Fourth edition. Ed. W.B. Saunders Company. Cap. 7 y 8.
3. Angulo, R., D.A. Fulcher. 1998. Measurement of *Candida*-Specific blastogenesis: Comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labeling of T cells, thymidine incorporation and CD69 expression. *Cytometry*. 34:149-151.
4. Aoki, Y., M. Lipsky, B. Fowler. 1990. Alteration in protein synthesis in primary cultures of rat kidney proximal tubule epithelial cells by exposure to gallium, indium, and arsenite. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 106:462-468.
5. Arosa, F. A., M. de Sousa. 1995. Iron differentially modulates the CD4-Ic and CD8-Ick complexes in resting peripheral blood T-lymphocytes. *Cellular Immunology*. 161:138-142.
6. Blakley, B., C. Sisodia, T. Mukkur. 1980. The effect of methylmercury, tetraethyl lead, and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 52:245-254.
7. Bigazzi, P.E. 1999. Metals and kidney autoimmunity. *Environmental health perspectives*. 107(5):753-764.
8. Bogdan, G., A. Sampayo-Reyes, H. Vasken Aposhian. 1994. Arsenic binding proteins of mammalian system: I. Isolation of three arsenite-binding proteins of rabbit liver. *Toxicology* 93:175-193.
9. Burns, L.A., E. Sikorski, J. Saady, A. E. Munson. 1991. Evidence for Arsenic as the immunosuppressive component of Gallium Arsenide. 1991. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 110:157-169
10. Burns L.A. y A. E. Munson. 1993. Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD25 (IL-2R/p55). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 178-186.
11. Caspar-Bauguil, S., M. Saadawi, A. Negre-Savayre, M. Thomsen, R. Salvayre, H. Benoist. 1998. Mildly oxidized low-density lipoproteins suppress the proliferation of activated CD4⁺ T-lymphocytes and their interleukin-2 receptor expression *in vitro*. *Biochemical Journal*. 330:659-666.
12. Corsini, E. L. Asti, B. Viviani, M. Marinovich, C. L. Galli. 1999. Sodium arsenate induces overproduction of interleukin-1 α in murine keratinocytes: role of mitochondria. *The Journal of Investigative Dermatology*. 113:760-765.
13. Chen, G.C., X.G. Shi, W. Tang, S.M. Xiong, J. Zhu, X. Cai, Z.G. Han, J.H. Ni, G.Y. Shi, P.M. Jia.

1997. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*. 89:3345-3353.
14. Chiou, H-Y., Y-M. Hsueh, L-L. Hsieh, L-I. Hsu, Y-H, Hsu, F-I, Hsieh, M-L. Wei, H-C. Chen, H-T. Yang, L-C. Leu, T-H. Chu, C. Chen-Wu, M-H. Yang, C-J. Chen. 1997. Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutation Research*. 386:197-207.
15. Deaton M.A., P. Bowman, G. Jones. 1990. Stress protein synthesis in human keratinocytes treated with sodium arsenite, phenyldichloroarsine and nitrogen mustard. *Fundamental Applied Toxicology*. 14:471-476.
16. De la Hera, A., M.L. Toribio, C. Márquez, M.A. Marcos, E. Cabrero, A.C. Martínez. 1986. Differentiation of human mature thymocytes existence of a T3+4-8-intermediate stage. *European Journal of Immunology*. 16:653-658.
17. De la Hera, A., M.L. Toribio, M.A. Marcos, C. Márquez, C. Martínez. 1987. Interleukin-2 pathway is autonomously activated in human T11+3-4-6-8-thymocytes. *European Journal of Immunology*. 17:683-687.
18. Descotes, J. 1986. *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals*, Elsevier. Amsterdam. 280:297-298.
19. Dock L., M. Vhater. 1998. *Metal toxicology*. Chapter 97. Pag. 2048-2052
20. Farrar, J., W. Benjamin, M. Hilfiker, M Howard, W. Farrar, Fuller-Farrar. 1982. The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody forming B cell responses. *Immunology review*. 63:129-166.
21. Farrell, R.P., M. Costa. 1997. *Carcinogenic inorganic chemicals*. Vol 12. Chapter 10. Pag.225-231.
22. Fernández-Botran, R., P. Chilton, Y. Ma. 1996. Soluble Cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy. *Advances in Immunology*. 63:269-273.
23. Freed, B., L. Geiselhart. 1997. Regulation of transcription by immunotoxicants. Chapter 19. Vol 5.
24. Gaffen, S., M. Goldsmith, W. Greene. 1998. Interleukin-2 and the interleukin-2 receptor. Chapter 4. *The cytokine Handbook*. 3a. Ed. Academic Press Limited.
25. Gebel, T. 2000. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology*. 144(1-3):155-62.
26. Germolec, D., T. Yoshida, K. Gaido, J. Wilmer, P. Simeonova, F. Kayama, F. Burlison, W. Dong, R. Lange y M. Luster. 1996. Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 141:308-318.
27. Gonsebatt, M.E., L. Vega, L.A. Herrera, R. Montero, E. Rojas, M.E. Cebrián, P. Ostrosky-Wegman. 1992. Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation.

- Mutation Research. 283:91-95.
28. Gonsebatt, M.E., L. Vega, R. Montero, G. García Vargas, L. Del Razo, A. Albores, M. Cebrián, P. Ostrosky-Wegman. 1994. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutation Research*. 313:293-299.
29. Healy, S. M., E.A. Casarez, F. Ayala-Fierro y H. V. Aposshian. 1998. Enzymatic methylation of arsenic compounds. V. Arsenite methyltransferase activity in tissues of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 148:65-70.
30. Harrison, T.M., K.L. McCoy. 2001. Immunosuppression by arsenic: a comparison of cathepsin L inhibition and apoptosis. *International Immunopharmacology*. 1:647-656.
31. Hodge, S., G. Hodge, R. Flower, P. Han. 2000. Surface and intracellular interleukin-2 receptor expression on various resting and activated populations involved in dendritic-mediated immunity in human peripheral blood. *Scandinavian Journal of Immunology*. 51:67-72.
32. Hossain, K., A. A. Akhand, M. Kato, J. Du, K. Takeda, J. Wu, K. Takeuchi, W. Liu, H. Suzuki, I. Nakashima. 2000. Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of c-jun amino-terminal kinase. *The Journal of Immunology*. 165:4290-4297.
33. Howard, M., L. Matis, T. Malek, E. Shevach, W. Kell, D. Cohen, K. Nakanishi, W. Paul. 1983. Interleukin 2 induces antigen-reactive T cell lines to secrete BCGF-1. *Journal of Experimental Medicine*. 158:2024-2039.
34. Hsu, Y., S. Li, H. Chiou, P. Yeh, J. Liou, Y. Hsueh, S. Chang y C. Chen. 1997. Spontaneous and inducer sister chromatid exchanges and delayed cell proliferation in peripheral lymphocytes of Bowen's disease patients and matched controls of arseniasis-Hyperendemic villages in Taiwan. *Mutation Research* 386:241-251.
35. Hu, Y, L. Su, E. T. Snow. 1998. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutation Research*. 408:203-218.
36. Huang, S.C., F. Chi-Ying, T.C. Lee. 2000. Induction of mitosis-mediated apoptosis by sodium arsenite in HeLa S3 cells. *Biochemical Pharmacology*. 60:771-780.
37. Hutchinson, P., L. A. Davioli, S. R. Holdsworth. 1999. Mitogen-induced T-cell CD69 expression is a less sensitive measure of T-Cell function than [³H]-Thymidine uptake. *Cytometry*. 38:244-249.
38. IARC (International Agency for Research). 1987. Overall evaluations of carcinogenicity, in: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans*. IARC, Lyon, 7:100-106.
39. Institóris, L., O. Siroki, Ü. Ünderger, N. Basaran, I. Dési. 2000. Immunotoxicological investigation of subacute combined exposure by permethrin and the heavy metals arsenic (III) and mercury (II) in rats. *International Immunopharmacology*. 1:925-933.
40. Janeway, C., P. Travers, M. Walport, D. Capra. 1999. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 4^a Ed. Cap. 5 y 8. Garland Publishing.

41. Jerrells, T.R., S.B. Pret. 1994. *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. 2a. Ed. Raven. New York. 323-347.
42. Jha, A.N., M. Noditi, R. Nilsson, A.T. Natarajan. 1992. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutation Research*. 284;215-221.
43. Karttunen, R, S. Silvennoinen-Kassinen, K. Juutinen. 1988. Nickel antigen induces IL-2 secretion and IL-2 receptor expression mainly on CD4⁺ T cells, but no mesuragle gamma interferon secretion in peripheral blood mononuclear cell cultures in delayed type hypersensitivity to nickel. *Clinical Experimental Immunology*. 74:387-391.
44. Keyse, S., L. Applegate, Y. Tromvoukis, R. Tyrrell. 1990. Oxidant stress leads to transcriptional activation of the human heme oxygenase gene in cultured skin fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 4967-4969.
45. Künding, T., H. Schorle, M. Bachman, H. Hengartner, R. Zinkernagel, I. Horak. 1993. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science*. 262:1059-1061.
46. Lee, T., M. Oshimura, J. Barrett. 1985. Comparison of arsenic-induced cell transformation , cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis*. 6:1421-1426.
47. Lee. T., N. Tanaka, P. W Lamb. 1988. Induction of gene amplification by arsenic. *Science*. 241:79-80.
48. Li, J., T. Rossman. 1989. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite a possible mechanism for its comutagenesis. *Molecular Toxicology*. 2:1-9.
49. Li, J., .M., J. D. Broome. 1999. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Research*. 59:776-780.
50. Li, W., I-N. Chou. 1992. Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels incultured cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 114:132-139.
51. Leonard, W., T. Donolon, R. Lebo, W. Greene. 1985. Localization of the gene encoding the human interleukin 2 receptor on chromosome 10. *Science*. 228:1547-1549.
52. López-Cabrera, M., A.G. Santis, E. Fernández-Ruíz, R. Blancher, F. Esch, P. Sánchez-Mateos, F. Sánchez-Madrid. 1993. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 178:537-547.
53. Lu, P., F. Sharom. 1995. Gangliosides are potent immunosuppressor of IL-2-mediated T-cell proliferation in a low protein environment. *Immunology* 86:356-363.
54. Lynn, S. J-R. Gurr, H-T. Lai, K-Y. Jan. 1999. NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 86:514-519.
55. Lyons, A.B. 2000. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement

of CFSE dye

56. Mäki-Paakkanen, J, Kurttio, Pälvi, Paldy, A., Pellanen J. 1998. Association Between the Clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 32:301-313.
57. McCabe, M.J. 1997. T. cell regulatory Functions. *Comprehensive toxicology. Toxicology of the immune system*. Vol 5.
58. Mass, M. J., Wang, L. 1997. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutation Research* 386:263-277.
59. Menzel, D., H. Hamadeh, E. Lee, D. Meacher, V. Said, R. Rasmussen, H. Greene, R. N. Roth. 1999. Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells. *Toxicology Letters*. 105:89-101
60. Mondiano, J., D. Amra, G. Lack, K. Bradley, C. Ball, J. Domenico, E. Gelfand. 1997. Posttranscriptional Regulation of T-Cell IL-2 Production by human pooled Immunoglobulin. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 83(1):77-85.
61. Namgunf U.K. y Z. Xia. 2001. Arsenic induces apoptosis in rat cerebellar neurons via activation of jnk and p38 MAP kinases. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 174:130-138.
62. Ohtsuka K., A. Masuda, A. Nakai. 1990. A novel 40-kDa protein induced by heat shock and other stresses in mammalian and avian cells. *Biochemistry and Biophysic Research Communication*. 166:642-647.
63. Ostrosky-Wegman P., M.E. Gonsebatt, R. Monetro, L. Vega , H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, García-Vargas G., Del Razo L.M., Cebrián M. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Research*. 250:477-482.
64. Pahlavani, M.A., D.A. Vargas. 2000. The effect of ceramide analog, N-acetylsphingosine on the induction of proliferation and IL-2 synthesis in T. cells from young and old F344 rats. *Immunopharmacology*. 49:345-354.
65. Park, J.W. Y.J. Choi, M. A. Jag, S. H. Baek, J.E. Lim, T. Passaniti, T. K. Kwon. 2001. Arsenic trioxide induces G2/M growth arrest and apoptosis after caspase-3 activation and Bcl-2 phosphorylation in promonocytic U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286:726-734.
66. Paul W.E. 1998. *Fundamental Immunology*. Chapter 12. Lippicott-Raven. Pag. 411-447.
67. Peltier, M. R., W-J, Liu, P. J. Hansen. 2000. Regulation of lymphocyte proliferation by uterine serpin: interleukin-2 mRNA production, CD25 expression and responsiveness to interleukin-2. *P.S.E.B.M.* 223:75-81
68. Ramírez, P., D. Eastmond, J.P. Lactette, P. Ostrosky-Wegman. 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium

- arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 386:291-298.
69. Rasmussen, R., D. Menzel. 1997. Variation in arsenic-induced sister chromatid exchange in human lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutation Research*. 386:299-306.
70. Redondo, J.M., M. Fresno, A. López-Rivas. 1998. Inhibition of interleukin 2-induced proliferation of cloned murine T cells by glucocorticoids. Possible involvement of an inhibitory protein. *European Journal of Immunology*. 18:1555-1559.
71. Robb, R., W. Greene. 1987. Internalization of interleukin 2 is mediated by the β chain of the high-affinity interleukin 2 receptor. *Journal Experimental Medicine*. 165:1201-1206.
72. Rossman, T.G., D. Wolosin. 1992. Differential susceptibility to carcinogen-induced amplification of SV40 and *dhfr* sequences in SV40-transformed human keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*. 6:203-213.
73. Roussel, R., A. Barchowsky. 2000. Arsenic inhibits NF- κ B mediated gene transcription by blocking I κ B kinase activity and I κ B α phosphorylation and degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 377:204-212.
74. Rousselot P., S. Labaume, J.P. Marolleau, J. Larghero, M.H. Noguera. 1999. Arsenic trioxide and melarspol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Research* 59:1041-1048.
75. Rozwaski, D., A. Gronenborn, G. Clore, J. Bazan, A. Bohm, A. Wlodawer, M. Hatada, P. Karplus. 1994. Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure*. 2:159-173.
76. Rutella, S., C. Rumi, M.B. Lucia, T. Barberi, P.L. Puggioni, M. Lai, A. Ronabi, R. Cauda, G. Leone. 1999. Induction of CD69 antigen on normal CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subsets and its relationship with the phenotype of responding T-Cells. *Cytometry*. 38:95-101.
77. Salazar, A., P. Ostrosky-Wegman, D. Menéndez, E. Miranda, A. García-Carrancá, E. Rojas. 1997. Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutation Research*. 381:259-265.
78. Salazar, A.M. 1998. Mecanismos moleculares de la alteración proliferativa inducida por el arsénico. Tesis Doctoral. UNAM. México. 256 p.
79. Santis, A. G., M. López-Cabrera, F. Sánchez-Madrid, N. Proudfoot. 1995. Expresión of the early lymphocyte activation antigen CD69, a C-type lectin, is regulated by mRNA degradation associated with AU-rich séquence motifs. *European Journal of Immunology*. 25:2142-2146.
80. Seigel, L.J., M.E. Harper, S.F. Wong, R.C. Gallo, W.G. Nash, S.J. O'Brien. 1984. Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. *Science*. 223:175-178.
81. Shen, X., K. Lee, R. König. 2001. Effects of heavy metal ions on resting and antigen-activated CD4⁺ T cells. *Toxicology*. 169:67-80.
82. Simeonova, P., S. Wang, W. Toriuma, V. Kommineni, J. Matheson, N. Unimye, F. Kayama, D. Harki, M. Ding, V. Vallyathan, M. Luster. 2000. Arsenic mediates cell proliferation and gene

- expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Research*. 60:3445-3453.
83. Sikorski, E.E., L.A. Burns, M.L. Stern, M.I. Luster, A.E. Munson. 1991. Splenic cell targets in gallium arsenide-induced suppression of the primary antibody response. *Toxicology and applied pharmacology*. 110:129-142.
84. Smith, K. A. 1988. Interleukin-2 Inception, Impact, and implications. *Science*. 240:1169-1176.
85. Smith, K.A. 1992. Interleukin-2. *Current Opinion in Immunology*. 4:271-276.
86. Snyder R., G. Davis, P. Lachmann. 1989. Inhibition by metals of X-ray and ultraviolet-induced DNA repair in human cells. *Biological Trace Elements Research*. 21:389-398.
87. Styblo, M., D. Thomas. 1997. Binding of arsenicals to proteins in and *in vitro* methylation system. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 147:1-8.
88. Testi, R., D. D'Ambrosio, R. De Maria, A. Santoni. 1994. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunology today*. 15:479-483.
89. Theocharis, S., A. Margeli, P. Panayiotidis. 1991. Effects of various metals on DNA synthesis and lymphokines production by human peripheral blood lymphocytes *in vitro* *Comp. Biochem. Physiol.* 99C(1/2):131-133.
90. Toribio, M., J. Gutiérrez-Ramos, L. Pezzi, M. Marcos, C. Martínez. 1989. Interleukin-2 dependent autocrine proliferation in T-cell development. *Nature*. 342:82-85.
91. Trouba, K.J., E.M. Wauson, R.L. Vorce. 2000. Sodium arsenite-induced dysregulation of proteins involved in proliferative signaling. *Toxicology Applied and Pharmacology*. 164(2):161-70
92. Ullman, K., J. Northrop, C. Verweij, G. Crabtree. 1990. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annual Review Immunology* 8:421-452.
93. Vahter, M. 1999. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Science Program*. 82:69-88.
94. Vahter, M. 2000. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicology Letters* 112-113:209-217.
95. Vahter, M., G. Concha. 2001. Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacology and Toxicology*. 89:1-5.
96. Vega, L., M. Gonsebatt, P. Ostrosky-Wegman. 1995. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes *in vitro*: an individual susceptibility effect detected. *Mutation Research*. 334:365-373.
97. Vega, L. 1998. Tesis doctoral. Efectos inmunotoxicológicos del arsénico. UNAM. México. 76 p.
98. Vega, L., P. Ostrosky-Wegman, T. I. Fortoul, C. Díaz, V. Madrid, R. Saavedra. 1999. Sodium arsenite reduces proliferation of human activated T-cells by inhibition of the secretion of interleukin-2. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 21(2):203-220.

99. Voet, D., J. Voet. 1992. Bioquímica. Cap 19 y Cap 14. Ed. Omega. Barcelona. 412-414 y 550-552.
100. Wang, Y. D.S. Huang, R.R. Watson. 1994. *In vivo* and *in vitro* cocaine modulation on production of cytokines in C57BL/6 mice. *Life Sciences*. 54:401-411.
101. Wang, T-S. T-Y. Hsu, C-H. Chung, A. Wang, D-T. Bau, K-Y. Jan. 2001. Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 31(3):321-330.
102. Watson R. W., H.P. Redmond, J.H. Wang, D. Bouchier-Hayes. 1996. Mechanisms involved in sodium arsenite-induced apoptosis of human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 60:625-32.
103. World Health Organization (WHO). 1981. Arsenic. *Environmental Health Criteria* 18. Geneva: International Programme on Chemical Safety.
104. World Health Organization (WHO). 1993. Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. *Environmental Health Criteria*, 46, Ginebra.
105. Wildfang, E., T. R. Radabaugh, H. Vasken Aposhian. 2001. Enzymatic methylation of arsenic compounds. IX. Liver arsenite methyltransferase and arsenate reductase activities in primates. *Toxicology*. 168:213-221.
106. Yamanaka, K, S. Okada. 1994. Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environmental Health Perspectives*. 102:97-40.
107. Yoshida, T., T. Shimamura, S. Shigeta. 1986. Immunological effects of arsenic compounds on mouse spleen cells *in vitro*. *Tokai Journal of Experimental Clinical Medicine*. 11:353-359.
108. Yu, H-S., K-L. Chang, C-Li. Yu, C-S. Wu, G-S. Chen, J-C. Ho. 1998. Defective IL-2 receptor expression in lymphocytes of patients with arsenic-induced Bowen's disease. *Archives Dermatology Research*. 290:681-687.