



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**Análisis del efecto del arsénico sobre las  
subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>  
de linfocitos T humanos**

**T E S I S**

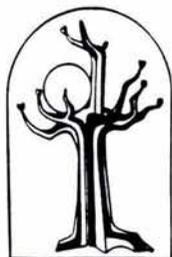
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA  
BASICA**

**P R E S E N T A**

**EDA PATRICIA TENORIO ZUMARRAGA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. RAFAEL SAAVEDRA DURAN**



**BIOMICAS**

**MEXICO, D. F.**

**2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Eda Patricia  
Tenorio Zumárraga

FECHA: 17 de septiembre 2004

FIRMA: 

Great Spirits Have Always Encountered  
Violent Opposition from Mediocre Minds

A. Einstein

Quisiera agradecer a algunas de las personas que han estado conmigo durante todo este proceso y me han enriquecido académicamente, pero en especial como persona.

Gracias a los H. Miembros del Jurado

Dra. Patricia Ostrosky

Dr. Edgar Zenteno

Dr. Rafael Saavedra

Dra. María Eugenia Gonsebatt

Dra. Teresa Fortoul

Por regalarme un poco de su conocimiento para enriquecer este trabajo

Al Dr. Roberto Coria y a la Dra. Laura Ongay

Mis primeros padres académicos, con ellos aprendí a amar mi profesión y que hay que dejar siempre un poco de uno mismo en cada experimento

Al Dr. Zentella

Por darme un lugar en su laboratorio y enseñarme que el trabajo es importante, pero que también hay otras cosas enriquecedoras en la vida

A mi familia

(I can hardly express my endless feelings and thankfulness for showing me the meaning of success ♪. ♪)

A mi mamá, Patricia Zumárraga

Gracias por hacer de mi lo que soy. Por hacerme consciente de las cosas esenciales, en fin, por ser y estar todo el tiempo conmigo

A mi papá, Juan Carlos Tenorio

Gracias por ver siempre en mi futuro la mejor inversión

A mi hermana, Karla Tenorio

Por las horas de risas, las tareas y por acompañarme en todo momento. Por volver muchas cosas más sencillas y hacer del mundo un mejor lugar para vivir

A mis abuelos, Hector y Elisa.

Por quererme entre sopas y galletas. Por cuidarme siempre, estén donde estén

A Hilda, Hector y Fabiola

Por estar en cada uno de los pasos necesarios para llegar a este momento, han aligerado mucho las cargas y presiones que implica existir

A Hector, Erendira, Kikis y Ale

Por tener siempre tiempo para llamar y preguntar como estoy a pesar del poco tiempo que tengo a veces y por tratar siempre de entender las cosas que digo por complicadas que sean.

A mis amigos

(You are the rock upon which I stand ☺)

A Alejandro. Gracias por tener un abrazo para mí en cualquier momento y por enseñarme la importancia de conocerse a uno mismo

A Luis. Por todos los allibajos que me diste, gracias a ellos conocí límites en mí que nunca imaginé. Por estar conmigo siempre y quererme a pesar de todo

A Paco. Redefiniste mis conceptos de bondad y empatía. Gracias por tener siempre tiempo para escuchar y discutir las mismas cuestiones que nos aquejan. Muchas cosas han sido menos difíciles con tu compañía.

A Nohemí. Por ser un apoyo incomparable estos años, gracias por estar conmigo y sobre todo por la confianza que me regalaste

A Agustín. Fue gracias a un regalo tuyo que esta tesis fue mucho más fácil de escribir. Gracias por tratar de ver siempre las cosas desde mi lado, entenderlas y tener siempre algo que decir.  
You're the one that I adore

A La Hermandad de las Faldas Largas: Karla, Estela, Martha y Verónica. Después de tantos años seguimos compartiendo todo lo que pasa. Gracias por su infinita paciencia, su apoyo y por tolerar todos mis "no puedo"

A Irian. Mi primera alumna y orgullo profesional. Gracias por dejarme transmitirte un poco de lo que conozco y demostrarme que vale la pena invertir en la gente.

A David E. y a Dionisio K. por su apoyo moral en los tiempos difíciles y siempre tener un buen consejo para mí.

Y en especial a Rafael Saavedra:

No existen las palabras para agradecerte todo lo que haz hecho por mí. Nunca nadie había confiado tanto en mi capacidad y en mi persona. Gracias por ser mi mentor, por enseñarme a trabajar bien y por llevarme al mundo de la inmunología, pero más que nada gracias por ser mi amigo. Nada de esto habría sido posible sin ti.

## Resumen

La contaminación de agua de bebida por arsénico es un problema que afecta muchas regiones del mundo. El arsénico es un cancerígeno humano que está asociado con el desarrollo de cáncer y de otras enfermedades. Hemos reportado la reducción de la proliferación en linfocitos T de sangre periférica humana al ser expuestos a arsénico in vitro y estimulados con PHA. El objetivo de este trabajo es determinar los efectos inmunotóxicos del arsénico en los linfocitos T  $CD4^+CD8^-$  y  $CD8^+CD4^-$ . Purificamos linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$  de sangre periférica humana, los estimulamos con PHA y observamos el efecto de varias concentraciones de arsénico ( $1-5\mu M$ ). Analizamos el efecto en la proliferación celular con el colorante CFSE, y encontramos que en ambas poblaciones el arsénico disminuye el número de divisiones de manera dosis dependiente, sin embargo esta disminución es mayor en los linfocitos  $CD8^+CD4^-$ . Al analizar el ciclo celular encontramos que en ambas poblaciones se reduce el número de células tanto en S como en  $G_2/M$  de manera dosis dependiente, así como el porcentaje de células apoptóticas, aun cuando el porcentaje de viabilidad celular no cambia para ninguna de las poblaciones. Finalmente analizamos la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69, los cuales muestran en ambas poblaciones una cinética de expresión retardada. Sin embargo, en el caso de los linfocitos  $CD8^+CD4^-$  se acumula una población que parece incapaz de activarse. Estos datos sugieren que los linfocitos  $CD8^+CD4^-$  son más sensibles al arsénico que los  $CD4^+CD8^-$ , tanto a nivel de activación como de proliferación.

# ÍNDICE

<b>I INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Arsénico.....</b>	<b>3</b>
1.1 Propiedades Físicoquímicas y usos del arsénico .....	3
1.2 Contaminación por arsénico.....	3
1.3 Metabolismo del Arsénico .....	4
1.4 Efectos sistémicos del Arsénico .....	5
1.5 Efectos del arsénico a nivel celular .....	6
1.6 Efectos del As en el sistema Inmune .....	10
<b>2 Linfocitos T .....</b>	<b>11</b>
2.1 Activación y proliferación del linfocito T .....	13
2.2 Co-receptores CD4 y CD8 .....	14
2.3 Cascadas de señalización.....	16
2.4 CD69 .....	18
2.5 Interleucina 2.....	18
2.6 Funciones Efectoras .....	20
<b>II OBJETIVO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>24</b>
<b>1 Justificación y Objetivo .....</b>	<b>24</b>
<b>2 Enfoque Experimental .....</b>	<b>24</b>
<b>3 Diseño experimental.....</b>	<b>25</b>
<b>III MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>1 Medios de cultivo e hibridomas .....</b>	<b>26</b>
1.1 Medios de cultivo .....	26
1.2 Soluciones.....	26
1.3 Hibridomas.....	27
<b>2 Análisis de linfocitos T .....</b>	<b>27</b>
2.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).....	27
2.2 Separación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> por selección magnética positiva.....	27

<b>3</b>	<b>Citometría de flujo.....</b>	<b>29</b>
3.1	Citómetro de flujo.....	29
3.2	Inmunofluorescencias .....	29
3.3	Determinación de la proliferación por tinción con CFSE .....	30
3.4	Determinación de células apoptóticas y del ciclo celular .....	31
<b>4</b>	<b>Estadística .....</b>	<b>31</b>
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>1</b>	<b>Análisis del efecto del NaAsO<sub>2</sub> en PBMC humanos.....</b>	<b>32</b>
1.1	Montaje de la tinción de PBMC con el colorante CFSE .....	32
1.2	Efecto del NaAsO <sub>2</sub> sobre la proliferación de PBMC estimulados con PHA .....	36
1.3	Ciclo celular y apoptosis de linfocitos expuestos a NaAsO <sub>2</sub> .....	40
1.4	Expresión de las moléculas CD4 y CD8 en linfocitos expuestos a NaAsO <sub>2</sub> .....	44
1.5	Transformación blástica de linfocitos CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> expuestos a NaAsO <sub>2</sub> .....	46
<b>2</b>	<b>Análisis del efecto del NaAsO<sub>2</sub> en las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> .....</b>	<b>48</b>
2.1	Ensayos de proliferación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> utilizando el colorante CFSE.....	49
2.2	Análisis del ciclo celular y apoptosis de linfocitos CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> expuestos a NaAsO <sub>2</sub> .....	52
2.3	Análisis de la expresión de las moléculas CD69 y CD25 .....	54
<b>V</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>VI</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>67</b>

# I Introducción

## 1 Arsénico

### ***1.1 Propiedades Fisicoquímicas y usos del arsénico***

El arsénico (As) es un metaloide<sup>§</sup> y se encuentra en la familia VA (grupo 15) de la tabla periódica. El número atómico del As es 33, su peso molecular es de 74.92 y sus estados de oxidación son  $\pm 3$  y +5. Es un sólido con una densidad de 5.72 g/cm<sup>3</sup> y su abundancia en la corteza terrestre es de 1.8 ppm. En la naturaleza casi no se encuentra como elemento puro, en cambio, se encuentra en compuestos minerales como el realgar (As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) y el oropimente (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) [2,3]

El arsénico se utiliza en diferentes industrias. El trióxido de arsénico (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) se utiliza en la fabricación del vidrio, como parte de tratamientos para conservar maderas y es también parte de insecticidas y herbicidas. El arsenito de galio (GaAs) se utiliza como semiconductor y el disulfuro de arsénico (As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) y el trisulfuro de arsénico (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) se utilizan en la industria pirotécnica y como pigmentos en la fabricación de pinturas [3]. En forma contrastante, el As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> era antiguamente utilizado como tratamiento contra la sífilis, la dermatitis, el reumatismo y el asma; en la actualidad, este mismo compuesto se utiliza como tratamiento contra la leucemia promielocítica aguda [4-6].

### ***1.2 Contaminación por arsénico***

El arsénico es un contaminante del agua, del aire y del suelo que está comúnmente en la naturaleza como resultado de diferentes fuentes geológicas; como parte de depósitos metálicos y

---

<sup>§</sup> Metaloides: elementos cuyos símbolos están situados adyacentes a la línea diagonal escalonada de la tabla periódica, entre los metales y los no metales. Sus propiedades también son intermedias entre las de los metales y las de los no metales. [1]

minerales. Además de estas fuentes naturales, el arsénico es también un producto contaminante de los usos industriales antes mencionados.

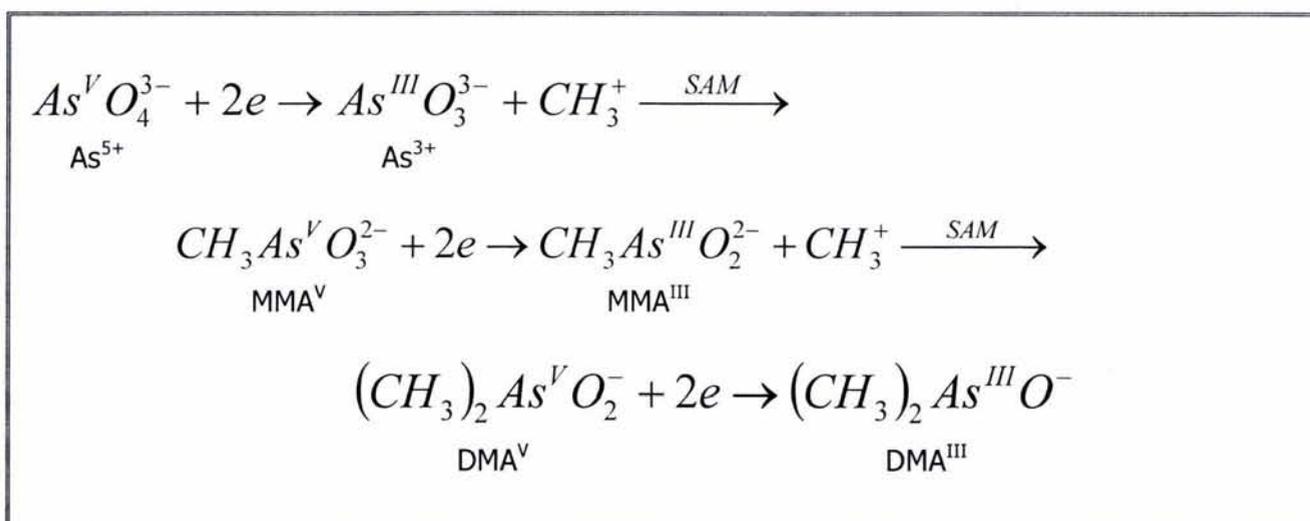
La contaminación del agua de bebida por arsénico es un problema serio de salud en diferentes países, como Argentina, Chile, China, Estados Unidos, India y Vietnam. En estos lugares la concentración de arsénico en el agua va de 1 a 48,000  $\mu\text{g/l}$  dependiendo del país y la región. En el caso de México se estima que aproximadamente unas 400, 000 personas están expuestas al aguas contaminadas por arsénico con concentraciones entre 10 y 4100  $\mu\text{g/l}$  [7], aún cuando la concentración máxima permitida en el país es de 50  $\mu\text{g/l}$  [8].

Las especies de arsénico más comunes en el agua de bebida son los arsenatos ( $\text{As}^{5+}$ ) y los arsenitos ( $\text{As}^{3+}$ )[9], siendo estos últimos los más reactivos. El  $\text{As}^{3+}$  se considera como una molécula más tóxica y más cancerígena que el  $\text{As}^{5+}$  debido a diversas características. El  $\text{As}^{3+}$  puede ingresar a la célula por difusión pasiva, mientras que el  $\text{As}^{5+}$  compete con las moléculas de fosfatos para atravesar la membrana celular. El  $\text{As}^{3+}$  es muy reactivo con los grupos tiol ( $\text{CH}_2\text{-SH}$ ), por lo que puede afectar la actividad de diferentes enzimas al unirse a residuos de cisteína importantes para su función, como es en el caso de la piruvato deshidrogenasa, de las tirosinofosfatasas y de algunas enzimas involucradas en la ubiquitinación de proteínas [10,11]. Por otro lado, el  $\text{As}^{5+}$  tiene una estructura similar al fosfato, por lo que se supone que podría interferir con la fosforilación oxidativa y por lo tanto con la generación de ATP. Finalmente, el  $\text{As}^{5+}$  es eliminado del organismo más rápido que el  $\text{As}^{3+}$  [12].

### ***1.3 Metabolismo del Arsénico***

El metabolismo del As en mamíferos tiene como resultado la formación de dos metabolitos metilados, el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA), los cuales se eliminan por excreción en la orina junto con pequeñas cantidades de As que no llega a metabolizarse. El metabolismo del As implica que se alternen un proceso de reducción y uno de metilación oxidativa, los cuales llevan a la formación de los metabolitos antes mencionados (Fig.1). Después de ser ingerido, el As se absorbe rápidamente y entra al torrente sanguíneo. En la sangre el  $\text{As}^{5+}$  es reducido a  $\text{As}^{3+}$  debido a una reacción con el glutatión, el cual funciona como donador de electrones. Posteriormente el  $\text{As}^{3+}$  es transportado al hígado, donde es metilado,

principalmente en el citosol de los hepatocitos, y da lugar al MMA<sup>V</sup> y MMA<sup>III</sup>; posteriormente, es metilado una vez más para formar DMA<sup>V</sup> y DMA<sup>III</sup>. Estas reacciones utilizan a la S-adenosilmetionina (SAM) como donador del grupo metilo [13,14]. Finalmente, se excreta en la orina entre el 10 y 30% como As, entre el 10 y el 20% como MMA<sup>V</sup> y MMA<sup>III</sup> y entre el 60 y 80% como DMA<sup>V</sup> y DMA<sup>III</sup>. Debido a esto se ha considerado la biometilación del As como la mayor vía de desintoxicación, sin embargo, resulta importante aclarar que los metabolitos trivalentes del arsénico metilado son muy tóxicos, debido a que son más reactivos que el As y son potentes inhibidores de algunas reductasas [15,16].



**FIG. 1 METABOLISMO DEL ARSÉNICO [13]**

### **1.4 Efectos sistémicos del Arsénico**

Se sabe que a altas concentraciones el As es un tóxico de efecto inmediato, sin embargo la intoxicación crónica con As tiene repercusiones de otra índole, las cuales dependen no sólo de la concentración, sino también de la vía y del tiempo de la exposición [7,17,18]. Las manifestaciones clínicas de la intoxicación crónica con As incluyen astenia, cefaleas, hiper e hipopigmentación, queratosis, anemia y hepatomegalia, por mencionar las más comunes [19,20]. Por otro lado, también se ha relacionado la exposición crónica al As con enfermedades de tipo cardiovasculares, diabetes, algunas neuropatías y directamente con el desarrollo del "pie negro", que es una enfermedad vascular endémica de Taiwán [18,21-24].

El As es un cancerígeno, pues la ingestión crónica de As se ha relacionado principalmente con el desarrollo de cáncer de piel, y existe evidencia que relaciona la ingestión crónica de As con el desarrollo de cáncer de hígado, riñón y vejiga. En el caso de la exposición a As por inhalación, que es en su mayoría el caso de la exposición ocupacional, se ha demostrado también una asociación con el desarrollo de neoplasias en el tracto respiratorio [25,26]

### ***1.5 Efectos del arsénico a nivel celular***

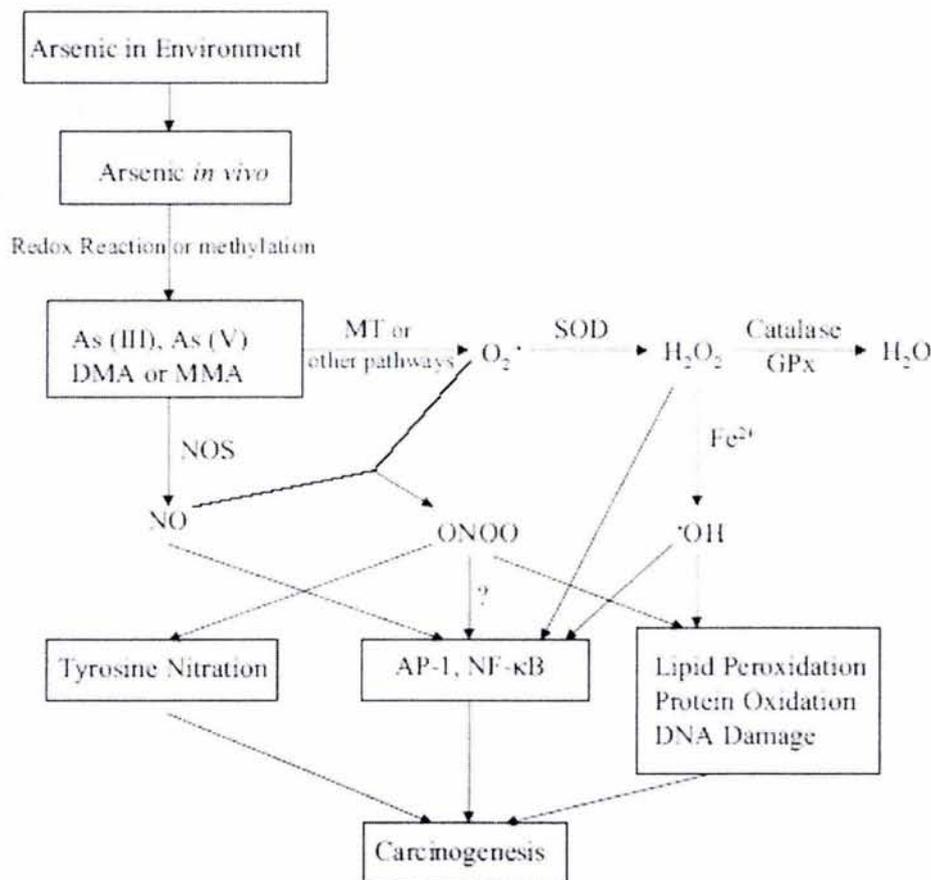
El As se considera un cancerígeno atípico, pues no está clasificado ni como iniciador ni como promotor de procesos cancerígenos, y aun cuando no se conocen claramente los mecanismos moleculares por los cuales el As genera procesos cancerígenos, existen varias teorías al respecto. Se propone que su papel es incrementar el efecto de otros cancerígenos [14,27,28]. Pero se considera también que su toxicidad es debido a su alta reactividad con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, alterando la estructura y por lo tanto la función de diversas moléculas; de hecho, se sugiere que la alta incidencia de cáncer de piel asociada con la exposición crónica a As está relacionada a la gran cantidad de queratina que hay en la piel, pues es una molécula rica en grupos sulfhidrilo [14,29]. Existen otros daños en las células como resultado de la exposición al As que han sido estudiados más a fondo y que son brevemente mencionados a continuación.

#### **1.5.1 Estrés oxidativo**

Durante el metabolismo del As se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radicales hidroxilo y singuletes de oxígeno [30,31]. Esta acumulación de especies reactivas de oxígeno, así como de especies de nitrógeno resultado de la exposición a As está claramente relacionada con daño celular (Fig. 2), prueba de ello es el hecho de que si se agrega superóxido dismutasa (SOD) a células humanas cultivadas en presencia de As se reduce el intercambio de cromátidas hermanas resultado de esta exposición [32]. Por otro lado el hecho de que la línea celular XRS-5 sea hipersensible al As resulta también un claro ejemplo del daño producido por especies reactivas de oxígeno, ya que estas células tienen baja actividad de catalasas [33].

El daño causado por ROS resulta importante sobre diferentes factores celulares, ya que pueden modificar la expresión genética, la estructura de proteínas, del DNA y pueden causar la peroxidación de lípidos [34,35] (Fig.3). Estos cambios pueden tener diferentes consecuencias en

las células, ya sea activando o inhibiendo otros procesos, por ejemplo, pueden hacer que la célula inicie un proceso canceroso o pueden enviar a la célula a apoptosis, sin embargo el resultado final no depende únicamente de las especies reactivas de oxígeno y de sus efectos, sino que involucra también muchos otros factores.



**FIG. 2 PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA CARCINOGENÉISIS QUE RESULTA DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO [35]**

## 1.5.2 Factores de transcripción y expresión genética

Ya sea por la generación de ROS o por alteraciones epigenéticas o mutagénicas en el DNA, el As altera la actividad de diferentes factores de transcripción, como AP-1, NF- $\kappa$ B, Nrf2 y p53 [34,36-39] así como la expresión de diversos genes.

En el caso de los factores de transcripción, se sabe que los cambios en la modulación de éstos dependen en gran parte de la concentración de As utilizada así como el tiempo de exposición. Un ejemplo muy claro es el caso de los factores AP-1 y NF- $\kappa$ B. Cuando las células son sometidas a un tratamiento agudo (24h) con dosis bajas de As se observa una activación de ambos factores, mientras que cuando son sometidas a un tratamiento crónico (70-150 días) se reduce la expresión basal de ambos. Se sugiere que el incremento en la actividad de dichos factores en tiempos cortos es un mecanismo de defensa, mientras que la reducción en la actividad de estos factores, resultado de la exposición crónica, puede ser un factor importante en los efectos carcinogénicos del As [34]. El hecho de que la exposición al As tenga como resultado la alteración de estos factores de transcripción resulta particularmente importante, ya que ambos están involucrados en la regulación de genes primordiales para la regulación de procesos como el ciclo celular y apoptosis[40,41].

En el caso de la expresión genética se han realizado análisis de microarreglos para determinar cambios en la expresión de diferentes genes. Se ha encontrado tanto sobreexpresión como inhibición de genes involucrados en el ciclo celular, la apoptosis, el estrés calórico y la reparación de DNA, entre otros (Tabla 1). La alteración de la expresión de estos genes confirma los daños celulares mencionados previamente y promueve nuevas preguntas respecto a la toxicidad del As.

<b>Gen</b>	<b>Descripción Función</b>	<b>Efecto del As en la expresión</b>
<b>HSPF1<sup>a</sup></b>	Homólogo de DNAJ (Hsp40) <i>Respuesta a estrés calórico</i>	Aumento
<b>H2BFQ<sup>a</sup></b>	Miembro Q de la familia de las histonas H2B <i>Remodelación de la cromatina</i>	Aumento
<b>BCL2<sup>a</sup></b>	B-cell CLL/Lymphoma 2 <i>Inhibición de procesos apoptóticos</i>	Aumento
<b>E2F<sup>b</sup></b>	Factor de Transcripción importante en la transición de la fase G <sub>1</sub> a la fase S	Aumento
<b>ERCC2</b> <b>ERCC5</b>	Miembros de la maquinaria de reparación de DNA por excisión-reparación de nucleótidos	Aumento
<b>RAD23A<sup>b</sup></b>		
<b>IL1β<sup>c</sup></b>	Interleucina 1 β <i>Activar linfocitos T y macrófagos</i>	Aumento
<b>CENPE<sup>a</sup></b>	Proteína E del centrómero <i>Replicación del DNA</i>	Disminución
<b>JAK1<sup>a</sup></b>	Janus cinasa 1 <i>Señalización</i>	Disminución
<b>MYC<sup>a</sup></b>	Homólogo del oncogén viral V-myc <i>Proto-oncogen</i>	Disminución
<b>TNFR1<sup>b</sup></b>	Receptor de la molécula TNF-α	Disminución
<b>FOS<sup>c</sup></b>	Homólogo del oncogén viral V-fos	Disminución
<b>RAB5A<sup>c</sup></b>	Miembro de la familia de oncogenes RAS <i>Involucrada en la endocitosis celular</i>	Disminución
<b>TOP1<sup>c</sup></b>	DNA Topoisomerasa 1 <i>Involucrada con la topología del DNA</i>	Disminución

**TABLA 1 ALTERACIÓN DE LA EXPRESION GENÉTICA POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A AS. (A) EN LA LÍNEA CELULAR HEK293 [42], (B) EN MUESTRAS HEPÁTICAS DE PACIENTES [43] Y (C) EN PBMC DE PACIENTES [44].**

### **1.5.3 Daño al DNA**

El daño al DNA generado por la exposición al As puede ser resultado de diversos factores mencionados previamente. Las especies reactivas de oxígeno pueden causar en el DNA deleciones, inserciones, y amplificaciones de secuencias; sin embargo no generan mutaciones puntuales [45,46]. En otros ensayos se ha demostrado que la exposición al As genera aberraciones cromosómicas y formación de micronúcleos [47]. Se ha demostrado también que inhibe la reparación de DNA debido a que inhibe a la DNA-ligasa en el proceso de excisión-reparación [28,48]. Finalmente, se ha demostrado que la exposición a As puede provocar tanto la hipometilación como la hipermetilación del DNA, lo cual tiene serias repercusiones en la regulación de la expresión genética [49,50]. La hipermetilación está asociada con el silenciamiento transcripcional, mientras que la hipometilación está asociada con la activación transcripcional [51]. Cualquiera de estas dos condiciones involucra una alteración en la expresión de genes que podrían ser importantes para la célula. Estos datos resultan relevantes debido a que las mutaciones, daño y rearrreglos de la estructura del DNA podrían ser, dependiendo de las regiones afectadas, tanto iniciadores como promotores de procesos cancerígenos.

### **1.6 Efectos del As en el sistema Inmune**

El efecto del As sobre el sistema inmune es diverso, ya que depende de la concentración, el tiempo de exposición y el tipo celular. El daño resultado de la exposición a As puede ser sobre la viabilidad celular, o sobre alguna función de la célula. Por ejemplo, en experimentos realizados en timocitos de ratas se sabe que el  $\text{NaAsO}_2$  induce apoptosis en concentraciones bajas como 0.01-1 $\mu\text{M}$  y necrosis a concentraciones de 10-100 $\mu\text{M}$  [52]. Se ha demostrado que los macrófagos de ratones expuestos a  $\text{NaAsO}_2$  (0.5 mg/kg), tienen un menor índice fagocítico, así como una menor capacidad de liberar óxido nítrico [53].

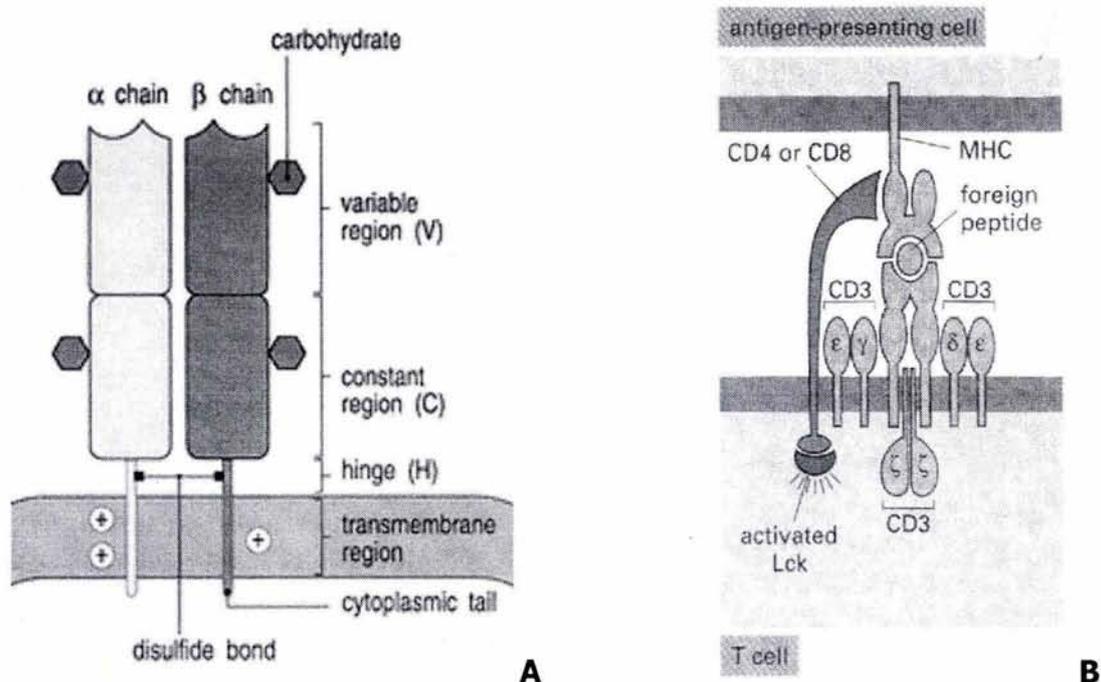
Los análisis realizados en linfocitos humanos han comprobado que el As tiene diferentes efectos sobre ellos. Se ha demostrado que el As genera aberraciones cromosómicas en los linfocitos expuestos a As *in vitro* [54], que induce el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos activados [55] y que afecta la estructura de diferentes compartimientos intracelulares [56]. Se ha confirmado que el As altera la expresión de diferentes genes en linfocitos de sujetos expuestos a As por agua de bebida (Tabla 1) [44]. Se sabe que la concentración de As resulta importante en la respuesta de los linfocitos, ya que a bajas concentraciones incrementa la

proliferación mientras que a altas concentraciones la inhibe [57]. Resulta particularmente importante que los linfocitos T de personas crónicamente expuestas a As tienen un índice de proliferación menor que el de personas no expuestas al ser activados con un mitógeno como la fitohemaglutinina (PHA) *in vitro* [58]. También se ha demostrado que los linfocitos tienen una menor proliferación al ser activados con PHA en presencia de As [59] y esta reducción en la proliferación se debe en parte a un retraso en la producción y secreción de IL-2 [56,60]. Finalmente, se ha reportado que en células mononucleares humanas no activadas el As induce la liberación de TNF- $\alpha$ , y también apoptosis; las células más propensas a apoptosis en este sistema son los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y se sugiere que se debe a que incrementan su expresión del receptor 1 del TNF (TNFR1) [61].

## **2 Linfocitos T**

Los linfocitos T se originan a partir de células madre en la médula ósea, pero migran al timo para madurar. Es debido a esta característica que reciben el nombre de linfocitos T. Los linfocitos T reconocen antígenos (Ag) vía el receptor de la célula T (TCR). El TCR (Fig. 3) está formado por una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ , o bien por una cadena  $\gamma$  y una  $\delta$ , las cuales están unidas por un enlace disulfuro. Cada una de las cadenas cuenta con una región constante (C), una región variable (V), y un pequeño extremo citoplásmico (Fig. 3)[62-64].

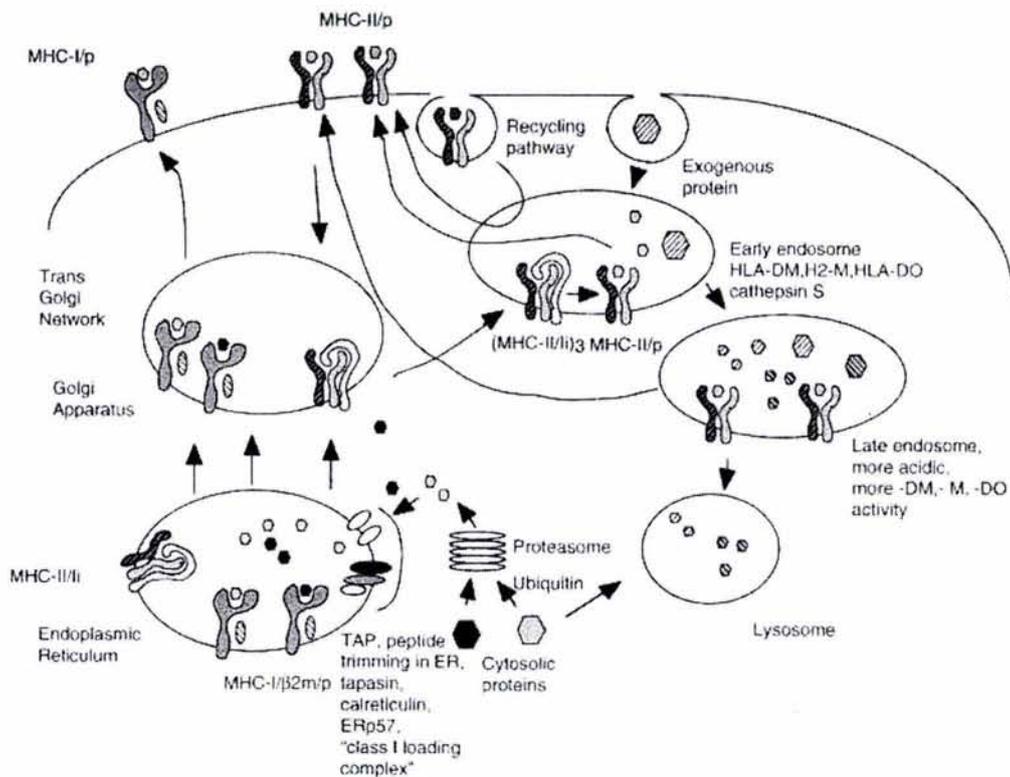
El TCR reconoce a su antígeno únicamente cuando este último ha sido procesado y está acoplado a una molécula de MHC. Las células encargadas de procesar y presentar antígenos reciben el nombre de células presentadoras de antígeno (APC), en este grupo se encuentran las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. Estas células degradan proteínas a péptidos que posteriormente son acoplados a moléculas de MHC para ser expuestos en la membrana y reconocidos por los linfocitos T. Existen dos clases de moléculas de MHC (MHC I y MHC II), cada una de las cuales presenta antígenos que han sido procesados de manera diferente y desencadenan respuestas diferentes por parte de los linfocitos T que los reconocen. Además de la unión del MHC:Ag con el TCR se requiere de la interacción de otras moléculas para generar una respuesta en el linfocito T, entre ellas el complejo CD3 y las moléculas CD4 o CD8 (Fig. 3B).



**FIG. 3 (A)ESTRUCTURA DEL TCR [63] Y (B) MODELO DE LA UNION DEL TCR/CD3 CON EL COMPLEJO MHC:AG Y LA MOLÉCULA CD4 O CD8[65].**

Las moléculas de MHC clase I presentan péptidos de antígenos que han sido procesados en el citoplasma de cualquier célula. Estos péptidos son generados por el proteosoma, transportados al retículo endoplásmico donde son acoplados a la molécula de MHC I y presentados en la superficie de la célula (Fig.4). El complejo MHCI:Ag es reconocido por linfocitos CD8.

Las moléculas de MHC clase II presentan péptidos de antígenos de origen extracelular. Las células presentadoras de antígeno endocitan proteínas que son posteriormente proteolizadas en los endosomas. Los péptidos resultantes de este procesamiento son acoplados a las moléculas de MHC II y son presentados en la superficie celular (Fig. 4). El complejo MHCII:Ag es reconocido por los linfocitos CD4 [66].

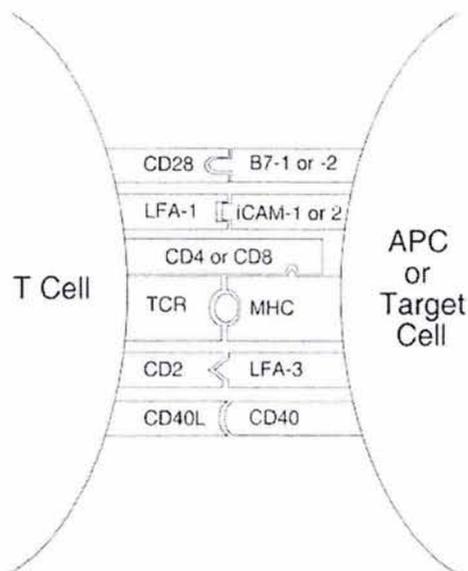


**FIG. 4. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS A TRAVÉS DE LAS MOLÉCULAS MHC I Y MHC II [67]**

## ***2.1 Activación y proliferación del linfocito T***

Fisiológicamente, los linfocitos T, ya sean "naïve" o de memoria, se encuentran en un estado de reposo, es decir, en la fase  $G_0$  del ciclo celular [68] y su activación depende principalmente de tres clases de interacciones. La primera involucra la unión del complejo TCR/CD3 en el linfocito T con el complejo MHC:Ag en la célula presentadora; la segunda se refiere a la unión del co-receptor CD4 o CD8 con la molécula del MHC I o II, respectivamente, y la tercera involucra receptores de coactivación, como el CD28 con B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86), y de moléculas de adhesión como el CD2 que interactúa con LFA-3 (Fig 5). La interacción de todas estas proteínas se conoce como sinapsis inmunológica y tiene como resultado el inicio de diversas cascadas intracelulares que conllevan a la proliferación del linfocito T [69]. La importancia de la sinapsis inmunológica radica en que se genera un espacio entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno que permite que se fortalezca la interacción entre ellas, así como la generación de una señal de activación más potente en el linfocito T [70].

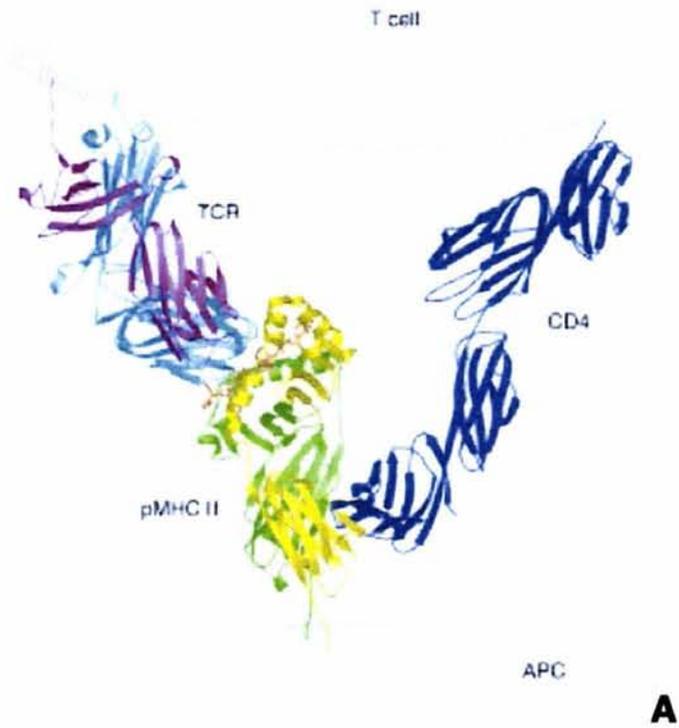
Los linfocitos T son activados cuando reconocen antígenos presentados por células presentadoras de antígeno. En modelos experimentales los linfocitos T pueden ser activados de varias maneras por ejemplo, utilizando anticuerpos dirigidos contra el TCR, el CD3 y el CD28; usando superantígenos, que son productos bacterianos o virales con la capacidad de activar grandes cantidades de linfocitos T, o bien usando mitógenos [71]. Los mitógenos más utilizados son lectinas como la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (ConA) que activan únicamente linfocitos T y el mitógeno de pokeweed (PWM) que activa tanto a linfocitos T como B [71,72].



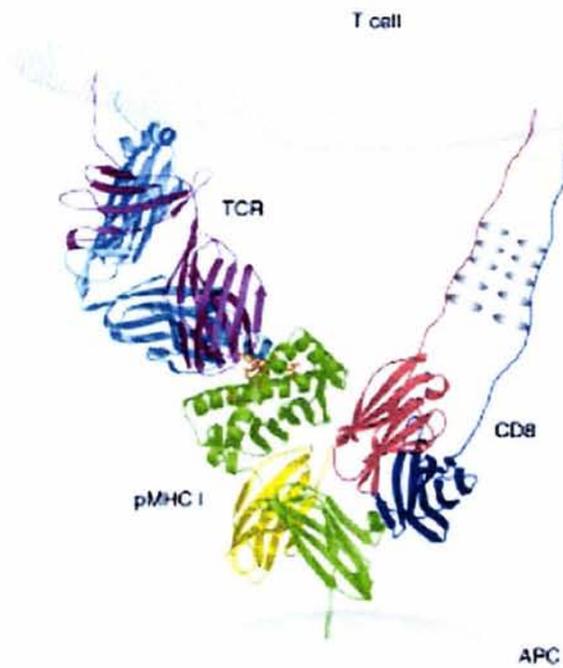
**FIG. 5 INTERACCIÓN DE ALGUNAS MOLECULAS IMPORTANTES PARA LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T [71]**

## ***2.2 Co-receptores CD4 y CD8***

Las moléculas CD4 y CD8 pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La molécula CD4 es una sola cadena compuesta de cuatro dominios extracelulares y es el ligando de las moléculas de MHC clase II (Fig. 6A). La molécula CD8 es un heterodímero compuesto de una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  unidas por un enlace disulfuro, o bien un homodímero de cadenas  $\alpha$ . Cada una de estas cadenas se une a la membrana celular a través de una larga cadena polipeptídica altamente glicosilada, y su ligando es la molécula MHC clase I (Fig 6B) [64].



**A**



**B**

**FIG 6 MODELO DE LA UNION DEL COMPLEJO MHC:AG CON EL TCR Y CON LA MOLÉCULA CD4 (A) Y CON LA MOLÉCULA CD8 (B) [73]**

Los co-receptores CD4 y CD8 tienen como función incrementar la sensibilidad del TCR con el complejo MHC:Ag, ya que, al menos en el caso de la molécula CD4, su falta de expresión o función limita entre 10 y 100 veces la sensibilidad del linfocito T por el antígeno [74]. También están involucradas con las señales de activación del linfocito T, debido a que ambas moléculas interactúan de manera no covalente con la tirosin-cinasa Lck, primordial para el inicio de la señalización del TCR [71]. Se ha sugerido que la interacción de Lck con la proteína ZAP-70 del TCR puede ser la encargada de reclutar a cualquiera de los co-receptores (CD4 o CD8) con el complejo MHC:TCR [69,75]. Cabe mencionar que la interacción de Lck con la molécula CD8 es menor en comparación con su afinidad con la molécula CD4. Aun cuando no se han analizado las consecuencias de este hecho se ha sugerido que las diferencias en esta interacción pueden llevar a eventos distintos en la señal de transducción [71].

### ***2.3 Cascadas de señalización***

La activación del linfocito T involucra diferentes vías de señalización, como podemos apreciar en la Fig. 7. Una vez que se ha iniciado la interacción del complejo TCR:CD3 con el MHC:Ag y de otras moléculas coactivadores, se activa Lck, la cual fosforila los motivos de activación de inmunoreceptores basados en tirosinas (ITAMs) de las cadenas del CD3, lo que permite la unión y la activación de la tirosina-cinasa ZAP-70. La molécula ZAP-70 activa, por un lado a Ras, el cual activa la vía de las MAP cinasas (MAPK), dando como resultado la activación del factor de transcripción AP-1. Por otro lado, ZAP-70 activa la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), la cual al actuar sobre la fosfatidil inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) da como resultado dos segundos mensajeros, el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DG). El IP<sub>3</sub> incrementa la concentración de calcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>), lo cual entre otras cosas activa al factor de transcripción NFAT. El DG junto con el Ca<sup>2+</sup>, activan a la proteína cinasa C (PKC), la cual activa a su vez al factor de transcripción NF- $\kappa$ B [76]. La activación de todos estos factores de transcripción tiene como resultado la generación de diferentes moléculas que le permiten al linfocito T salir de su estado de reposo y entrar a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. En este momento comienza la transcripción y síntesis de moléculas importantes para la proliferación celular como la IL-2 [71,76]. Posteriormente, la síntesis de DNA comienza alrededor de las 48 h, y dependiendo de la intensidad del estímulo, el pico de proliferación se da entre los días 3 y 7 después del inicio de la activación. Finalmente, el mayor porcentaje de estas células morirán por apoptosis y sólo un pequeño porcentaje de ellas será reservado como células de memoria [71].

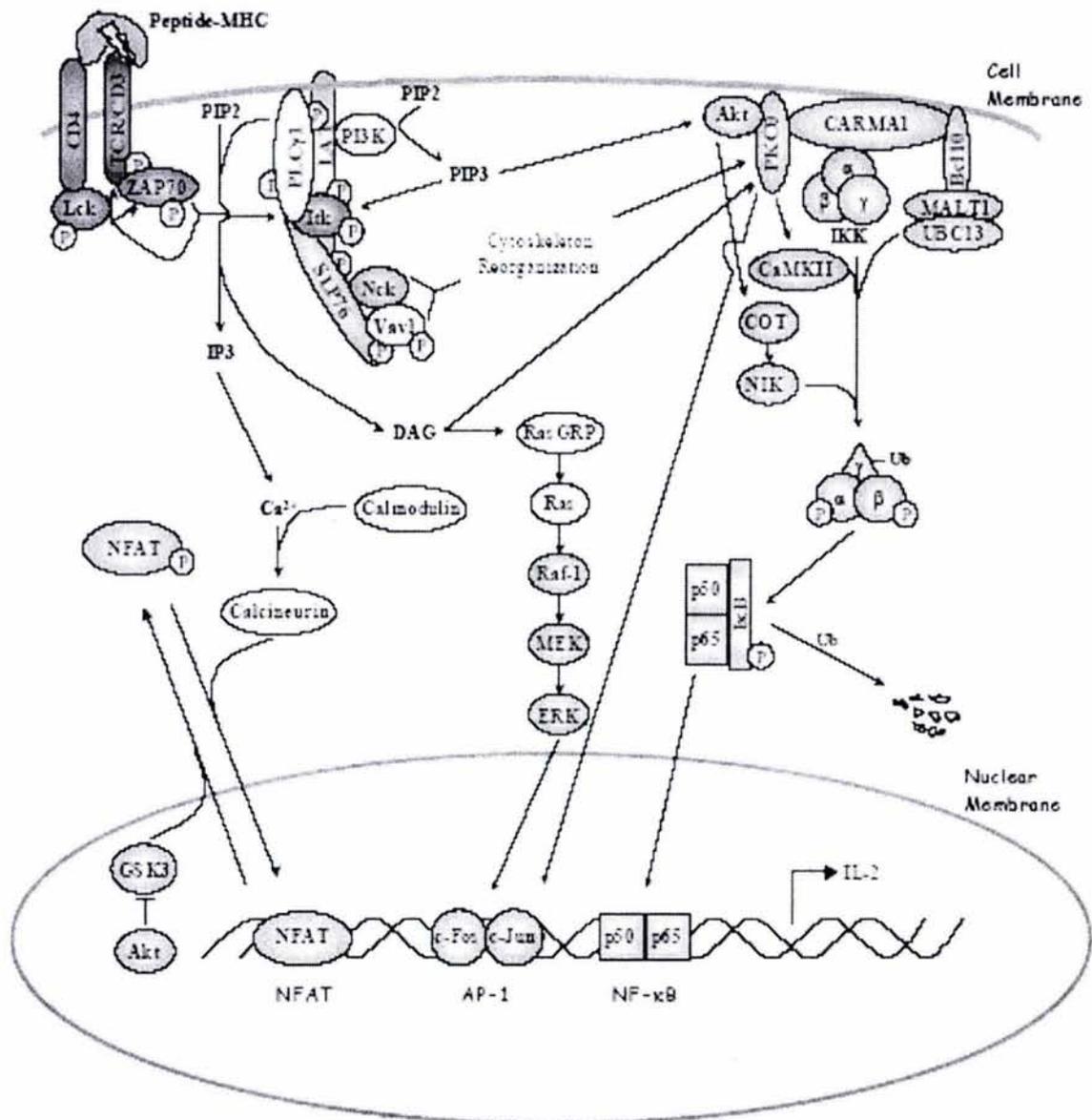


FIG. 6 CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T [76]

El estudio de todos estos mecanismos moleculares ha permitido comprender otros procesos celulares como la transformación blástica y la expresión de moléculas en la membrana del linfocito como el CD69 y CD25.

## ***2.4 CD69***

El marcador CD69 es una proteína integral de membrana con un dominio transmembranal y es parte de la familia de receptores de superficie de lectinas tipo C. Esta familia de receptores se ha asociado con funciones de endocitosis y degradación de glicoproteínas [77]. Este marcador se encuentra de manera constitutiva en linfocitos T, B y en células NK activadas, así como en monocitos. En el caso de los linfocitos T, los transcritos de CD69 pueden ser detectados entre los 30 y 60 min posteriores a la estimulación. La expresión del CD69 en la superficie de la célula se detecta a partir de las 2 o 3 h después de la estimulación y su pico de expresión es entre las 24 y 48 h, por lo que es utilizado como un marcador de activación temprana. Finalmente, se pierde su expresión durante las 24 h siguientes al retiro del estímulo [78]. La función de la molécula CD69 no está bien definida, pues no se conoce su ligando o co-receptor sin embargo se supone que puede funcionar como una molécula coestimuladora. El hecho de que se le atribuya a la molécula CD69 la capacidad de transducir señales se debe a que anticuerpos monoclonales anti-CD69 son capaces de inducir la proliferación de linfocitos en presencia de PMA [79].

## ***2.5 Interleucina 2***

Una vez que el linfocito T ha sido activado, la progresión en el ciclo depende de la unión de la IL-2 con su receptor, lo cual tiene como resultado la transformación blástica, la preparación metabólica del linfocito para la replicación del DNA y la mitosis y por lo tanto para la proliferación celular [80]. La IL-2 es un proteína de 15.5 KDa producida por linfocitos T activados, aunque los linfocitos B activados también pueden producirla, pero en menor cantidad [81]. La IL-2 es el factor primordial para la progresión de la fase G<sub>1</sub> al resto del ciclo celular en linfocitos T activados y promueve la diferenciación y expansión clonal de los mismos. Esta función es dependiente de la cantidad de IL-2 en el medio y de la cantidad de receptores en la célula [80,82]. La IL-2 está involucrada con la sobrevivencia de los linfocitos T así como con la generación de células de memoria. También está relacionada con la eliminación de los linfocitos T, promoviendo la apoptosis mediada por Fas en linfocitos CD4<sup>+</sup> [83]. La IL-2 también tiene efectos sobre otras células como linfocitos B y células NK. Se ha sugerido que la IL-2 puede participar durante el

desarrollo del linfocito T en el timo [81] y que puede tener un papel importante en la regulación negativa de la respuesta inmune, ya que ratones deficientes en IL-2 o en su receptor presentan síndromes autoinmunes [84]. La expresión del gen de la IL-2 depende de la interacción del TCR con su ligando así como de la activación de moléculas coestimuladoras como CD28.

El receptor de la IL-2 se compone de tres subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Las cadenas  $\beta$  (CD122) y  $\gamma$  ( $\gamma_c$ ) contienen en su región citoplásmica los elementos necesarios para transducir la señal intracelular. Cuando  $\beta$  y  $\gamma$  se unen forman un receptor de baja afinidad por la IL-2, sin embargo la unión de la IL-2 no transduce ninguna señal. Por otro lado, se ha demostrado que además de formar parte de este receptor la subunidad  $\gamma$  es parte de los receptores de otras citocinas (IL-4, 7, 9 y 15) [80]. La función de la cadena  $\alpha$  tiene la función de incrementar la afinidad del receptor por la IL-2 y recibe también el nombre de CD25. La molécula CD25 se expresa en linfocitos T, B y monocitos activados. [84]. Las tres subunidades del receptor no se unen de manera covalente, sino que interaccionan y son capaces de iniciar una señalización hasta que se les ha unido la IL-2 [80]. Cuando los linfocitos T son activados se inicia la producción del transcrito que codifica para el CD25, alcanzando un pico máximo a las 8 h post-estimulación. La expresión del CD25 en la membrana celular alcanza su expresión máxima entre las 48 y 72 h después de la estimulación [85]. Finalmente, hay una pérdida progresiva de la expresión del marcador hasta alcanzar una reducción de entre el 80 y 90 % entre los días 10 y 21 de cultivo [86].

Cuando la IL-2 se une con su receptor se inicia una serie de cascadas de señalización que tienen como consecuencia la activación de diferentes genes. Algunas de las cascadas utilizadas por el IL-2R son utilizadas también por el TCR, como por ejemplo la vía de las MAPK y la vía de PI3-K, sin embargo el IL-2R activa también la vía Jak-Stat que es particular de las señales transducidas por citocinas. El resultado de estas vías es la activación de factores de transcripción que activan o reprimen genes con diferentes funciones (Tabla 2), entre ellos Bcl-2, que al incrementar protege a la célula de entrar a apoptosis, y CR8, que favorece la transición entre las fases  $G_1$  y S [87].

<b>Gen</b>	<b>Expresión</b>	<b>Función</b>
<b>BCI-2</b>	Aumento	Inhibe la apoptosis evitando la liberación del citocromo C [88]
<b>CR6</b>	Aumento	Regula las fases G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> promoviendo o arretando el ciclo celular [89].
<b>CR8</b>	Aumento	Modula el paso de G <sub>1</sub> a S y promueve la sobrevivencia celular [90].
<b>IL-4R</b>	Aumento	Receptor de la IL-4. La IL-4 activa linfocitos T e inhibe a los linfocitos T <sub>H</sub> 1 [72].
<b>IL-7R</b>	Aumento	Receptor de la IL-7. La IL-7 es un factor de crecimiento para las células pre-B y pre-T [72]. También esta involucrada en la sobrevivencia y generación de células CD4 <sup>+</sup> de memoria[91]
<b>P27</b>	Aumento	Inhibe la actividad de G <sub>1</sub> /S-Cdk; ayuda a la célula a retirarse del ciclo celular cuando está totalmente diferenciada [92,93].
<b>Stat4</b>	Aumento	Su función es principalmente activada por la IL-12. Se sugiere que regula inhibidores del ciclo celular y está por lo tanto relacionada con la progresión del mismo. Se sugiere que juega un papel importante en desarrollo de células tipo T <sub>H</sub> 1 [94].
<b>Cdc25 B</b>	Disminución	Fosfatasa que actúa sobre CDK1. La activación de CKD1 se requiere para el inicio de la mitosis [95].
<b>Toso</b>	Disminución	Bloquea la apoptosis mediada por Fas [96].

**TABLA 2 GENES REGULADOS POR LA IL-2 EN LINFOCITOS T [87]**

## **2.6 Funciones Efectoras**

### **2.6.1 Linfocitos CD4<sup>+</sup>**

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se clasifican en diferentes subtipos de acuerdo a los patrones de citocinas que secretan una vez que han sido activados (Tabla 3). La primera distinción que se hizo fue entre los subtipos T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 [97]. Los linfocitos T<sub>H</sub>1 secretan principalmente IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  y los linfocitos T<sub>H</sub>2 secretan de manera característica IL-4 e IL-10. Las citocinas producidas por los linfocitos T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 son antagónicas, lo cual permite un sistema cruzado de regulación [98]. Todas estas citocinas funcionan tanto de manera autócrina como parácrina y se ha propuesto que los microambientes generados por la presencia de estas moléculas en el medio resultan determinantes para la polarización de otras células hacia una u otra respuesta [99]. Los linfocitos T<sub>H</sub>1 están encargados de mediar la respuesta inmune celular, ya que con el patrón de citocinas

que producen se activan células como macrófagos que están involucrados en la eliminación de patógenos intracelulares (Fig.8), mientras que los linfocitos T<sub>h</sub>2 están encargados de mediar la respuesta inmune humoral, por lo que resultan importantes para el control de alguna infecciones extracelulares (Fig. 8) [100].

Se ha descrito la existencia de otros dos subtipos de linfocitos T CD4, los T<sub>h</sub>0 y los T<sub>h</sub>3 [101,102];su clasificación depende del patrón de citocinas que secretan (Tabla 3), sin embargo sus características efectoras no están aún completamente definidas. Los linfocitos T<sub>h</sub>0 secretan una mezcla de citocinas tipo T<sub>h</sub>1 y tipo T<sub>h</sub>2, y originalmente se les consideró un precursor en el desarrollo de linfocitos T<sub>h</sub>1 y T<sub>h</sub>2, sin embargo esto no ha sido demostrado [101]. Los linfocitos T<sub>h</sub>3 (Tabla 3) secretan TGFβ y están principalmente relacionados con la inmunidad en mucosas; se ha demostrado que tienen un efecto supresor sobre linfocitos T<sub>h</sub>1 (Fig. 8)[102].

También se han descrito linfocitos T reguladores. A diferencia de los otros subtipos, no fueron identificados por el patrón de citocinas que producen, sino porque expresan de manera constitutiva la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25). Si bien estas células no han sido caracterizadas por completo, se sabe que tienen la capacidad de suprimir la proliferación y la producción de citocinas de otras clases de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Fig. 8), y que para que ocurra esta supresión se necesita que exista un contacto directo entre las dos células [103].

<b>Perfil de Citocinas</b>	<b>T<sub>h</sub>1</b>	<b>T<sub>h</sub>2</b>	<b>T<sub>h</sub>3</b>
<b>IFN-γ</b>	++++	-	+/-
<b>IL-4</b>	-	++++	+/-
<b>TGF-β</b>	+/-	+/-	++++
<b>IL-10</b>	-	++	+/-
<b>Factores de crecimiento/diferenciación</b>	IL-2	IL-2/IL-4	IL-4/TGF-β
<b>Ayuda</b>	DTH/IgG2a	IgG1/IgE	IgA
<b>Supresión</b>	Th2	Th1	Th1/Th2

**TABLA 3 CARACTERÍSTICA DE LOS SUBTIPOS DE LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup> [102]**

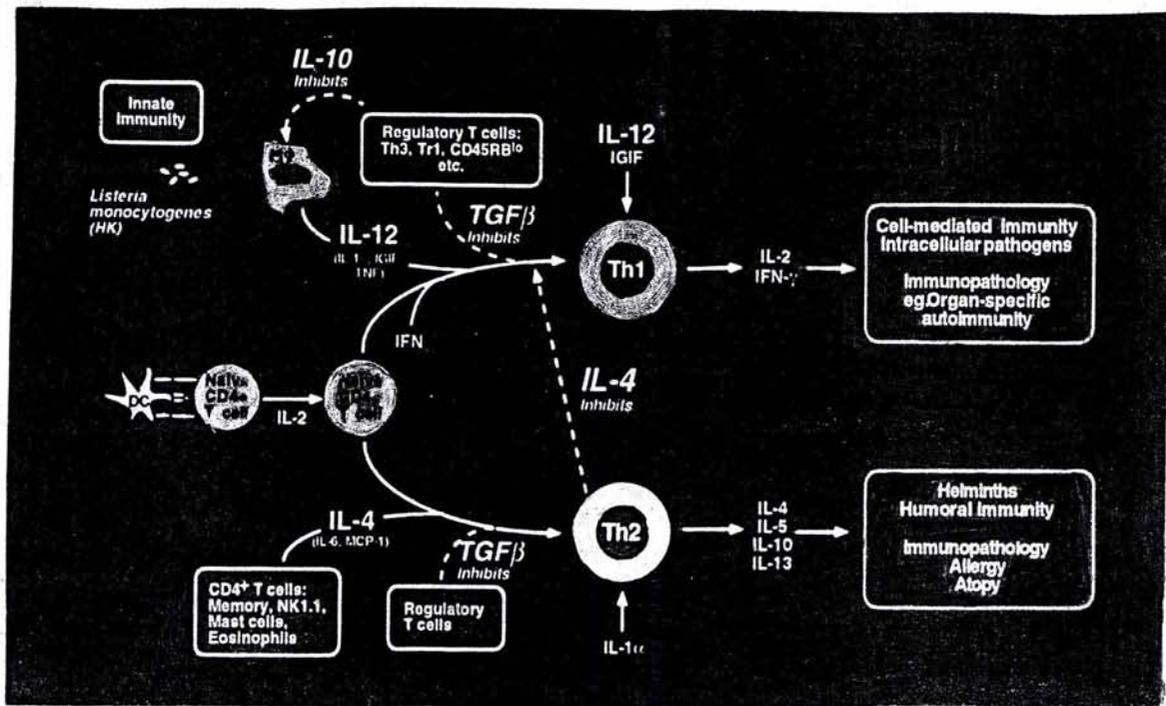


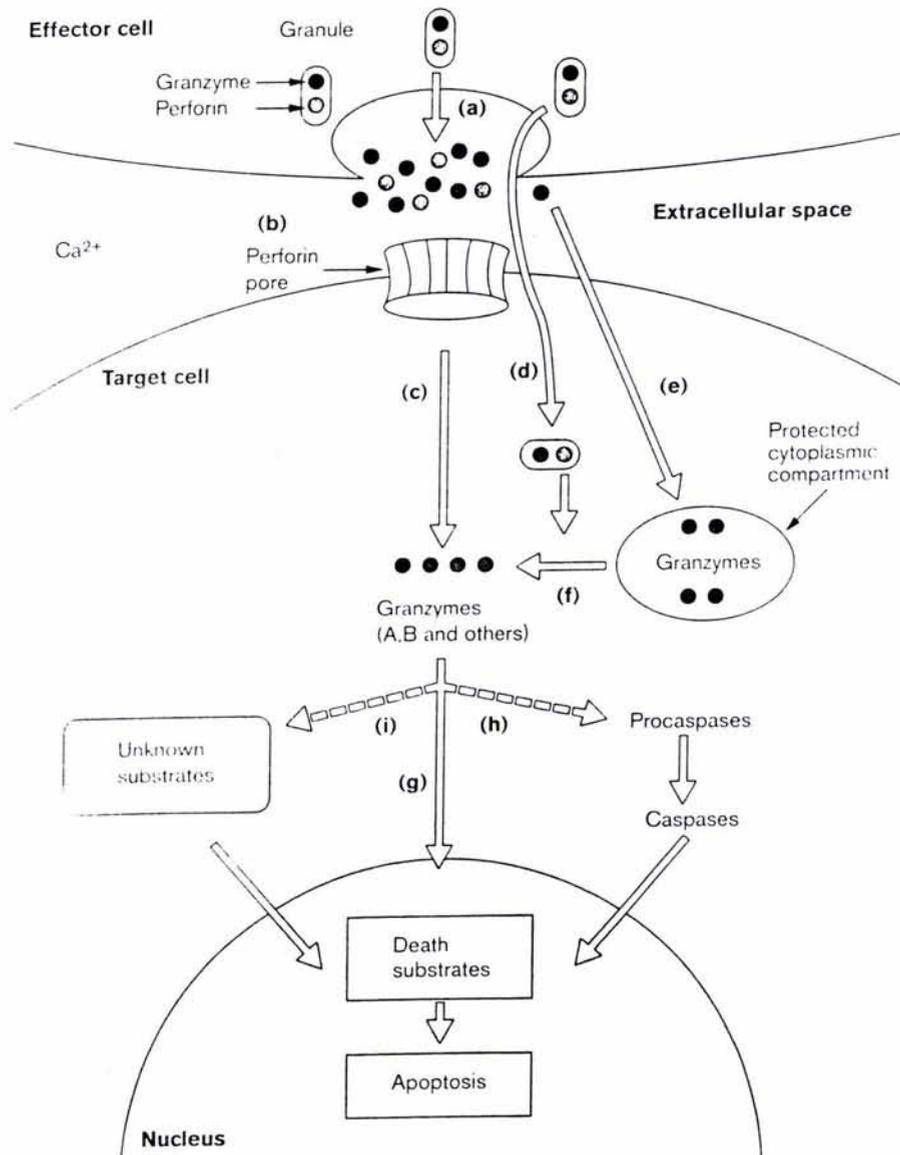
FIG. 7 FUNCIONES EFECTORAS DE LOS SUBTIPOS DE LINFOCITOS CD4 [100]

## 2.6.2 Linfocitos CD8

Los linfocitos CD8 se caracterizan por su función citotóxica y ha sido hasta hace poco tiempo que han sido clasificados por el patrón de citocinas que producen. De acuerdo a esta clasificación los linfocitos CD8 se dividen en T<sub>c</sub>1, (productores de IFN $\gamma$ ), T<sub>c</sub>2 (productores de IL-4 e IL-5) y T<sub>c</sub>0 (productores de IFN $\gamma$  e IL-4) [104]. A diferencia de los linfocitos T<sub>h</sub>1 y T<sub>h</sub>2, la cantidad de citocinas producidas por los T<sub>c</sub>1 y T<sub>c</sub>2 son mucho menores y por lo tanto no son capaces de actuar sobre otras células como lo hacen los CD4<sup>+</sup>. Se ha demostrado sin embargo, que en ratones deficientes en perforina, los linfocitos T<sub>c</sub>1 y T<sub>c</sub>2 producen mayor cantidad de citocinas y son capaces de ayudar a los linfocitos B a producir anticuerpos y de reclutar a otras células efectoras, sin embargo nunca a los niveles alcanzados por los CD4<sup>+</sup>. Finalmente, dado que tanto las células T<sub>c</sub>1 como las T<sub>c</sub>2 utilizan los mismos mecanismos de citotoxicidad (perforina, Fas y TNF $\alpha$ ) se ha sugerido que la producción de citocinas particulares está relacionada con una función citotóxica que sea apropiada para un ambiente T<sub>h</sub>1 o para un ambiente T<sub>h</sub>2 [105].

Debido a sus propiedades citotóxicas los linfocitos CD8 tienen como objetivo eliminar células infectadas, por lo que resultan particularmente importantes para el control de infecciones

virales y de bacterias citoplasmáticas, así como de algunos protozoarios. El mecanismo principal por el que los linfocitos CD8<sup>+</sup> eliminan las células infectadas es utilizando las moléculas perforina y granzimas (Fig. 9), las cuales son liberadas por los linfocitos CD8<sup>+</sup> después de reconocer el complejo MHC:Ag en la célula infectada. La perforina hace un poro en la membrana de la célula afectada a través del cual entran las granzimas. Las granzimas son serin-proteasas que activan caspasas y otros substratos que llevan a la célula a iniciar un proceso apoptótico. Otros mecanismos por los cuales los linfocitos CD8<sup>+</sup> inducen apoptosis es a través de la molécula FAS y de la producción de TNF  $\alpha$  [72,106].



**FIG. 8 ACCIÓN CITOTÓXICA DE LOS LINFOCITOS CD8<sup>+</sup>[106]**

## **II Objetivo y Enfoque experimental**

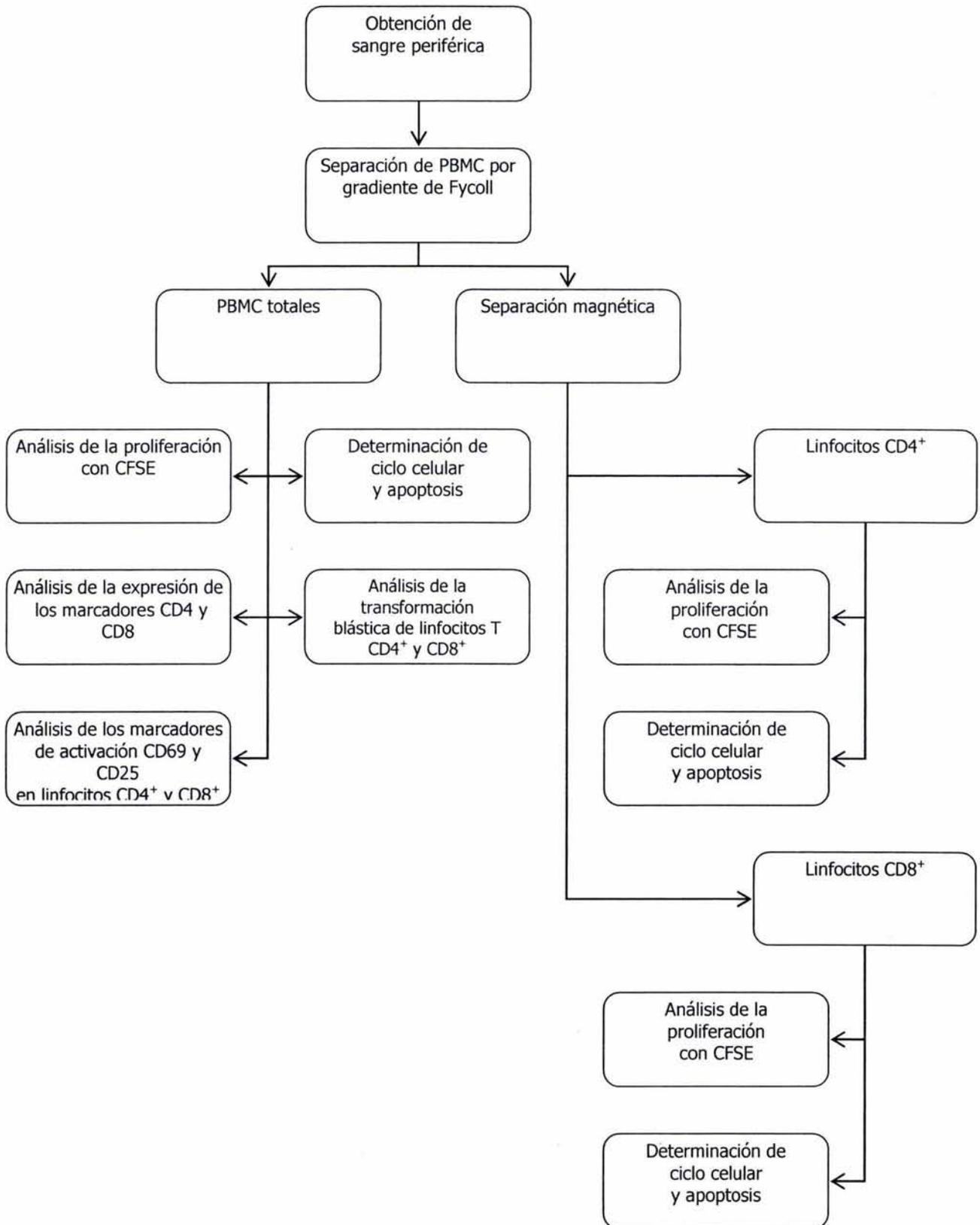
### **1 Justificación y Objetivo**

La intoxicación crónica con As por exposición a agua de bebida contaminada es un problema que afecta muchas regiones del mundo. El As es un cancerígeno que también está involucrado con el desarrollo de otras enfermedades como diabetes y desórdenes cardiovasculares. Se ha demostrado que el As tiene efectos tóxicos en el sistema inmune como es la reducción en la capacidad proliferativa de linfocitos T de sujetos expuestos a As por ingestión de agua contaminada. Debido a esto, y a los diferentes papeles que juegan los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el sistema inmune, el objetivo de este trabajo es determinar si el As tiene efectos diferentes en estas subpoblaciones, así como, de ser el caso, un posible mecanismo por el cual el As daña diferencialmente a estas subpoblaciones.

### **2 Enfoque Experimental**

El modelo que se utilizó consiste en incubar células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) con NaAsO<sub>2</sub> durante 24h y posteriormente activar los linfocitos T con el mitógeno PHA. El objetivo de incubar las células con NaAsO<sub>2</sub> antes de la activación es simular una exposición al compuesto previa al inicio de una respuesta inmune, ya que naturalmente, la exposición a As es crónica y es independiente del momento en que pueda iniciarse una infección. Se ha demostrado que existe una relación entre el tiempo de exposición a As con el daño post-activación de los linfocitos humanos [59], por lo cual se utilizó un rango de concentraciones que va de 1 a 5μM de NaAsO<sub>2</sub>.

### 3 Diseño experimental



# III Material y Métodos

## 1 Medios de cultivo e hibridomas

### *1.1 Medios de cultivo*

#### **1.1.1 RPMI-1640 completo**

El medio utilizado para el cultivo de células humanas es RPMI-1640, suplementado con 1mM piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 50u/ml de penicilina y 50µg de estreptomina (Gibco, Rockville, MD).

#### **1.1.2 DMEM completo**

El medio utilizado para el cultivo de hibridomas es el Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) (Gibco), suplementado con 1mM piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina, 0.1 mM aminoácidos no esenciales y 10 % (v/v) de SFB.

### *1.2 Soluciones*

#### **1.2.1 Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS)**

NaCl 138 mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM

#### **1.2.2 NaAsO<sub>2</sub>**

Se prepara el arsenito de sodio (Sigma, St. Louise, MO) a una concentración 0.1M en agua bidestilada y se esteriliza filtrando por una membrana de 0.22µm. Esta solución se debe guardar a -20°C por no más de seis meses, ya que después de este tiempo se reduce su actividad. Las diluciones utilizadas para cada ensayo se prepararon en RPMI completo al momento de realizar los experimentos.

### **1.3 Hibridomas**

Los sobrenadantes con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 fueron obtenidos del cultivo de los hibridomas OKT3, OKT4 y OKT8 (ATCC), respectivamente. Cada hibridoma fue sembrado en medio DMEM completo. Se recolectó el sobrenadante cuando las células estaban confluentes. Se centrifugaron los sobrenadantes a 490xg, se recuperaron, se filtraron por una membrana de 0.22µm y se guardaron a -20°C en alícuotas de 15 ml.

## **2 Análisis de linfocitos T**

### **2.1 *Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)***

Se obtuvo sangre de donadores sanos de entre 21 y 42 años. Para evitar la coagulación de la sangre se agregan 10 U de heparina/ml de sangre y se mezcla lentamente. La sangre se diluye al 50% con DPBS y se separan las células mononucleares haciendo un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). El gradiente se prepara agregando 3 ml de Ficoll-Paque en un tubo de 15 ml y después vertiendo cuidadosamente 10 ml de sangre, de modo tal que nunca se mezclen el Ficoll y la sangre. Se centrifugan los tubos a 490xg durante 30 min y se recuperan del gradiente las células mononucleares que se encuentran en el anillo blanco que se localiza en la interfase entre el Ficoll y el plasma. Las células se lavan 2 veces con 40 ml de DPBS centrifugando a 490xg por 5 min. Si las células se van a sembrar inmediatamente se resuspenden en RPMI completo y se cuentan; si se van a utilizar en alguna técnica posterior se resuspenden en DPBS, se cuentan y se utilizan inmediatamente.

### **2.2 *Separación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por selección magnética positiva***

#### **2.2.1 Soluciones**

- ✓ PBS (NaCl 154 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.05 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.95 mM)
- ✓ Buffer de separación: PBS + 2mM EDTA + 0.5% BSA, desgasificado. Este buffer se desgasifica por al menos 3 h y se conserva a 4°C.

## **2.2.2 Marcaje con anticuerpos**

Las células se dividen en dos tubos, para ser tratadas como muestras independientes, ya que de la primera se obtiene la fracción CD4<sup>+</sup> y de la segunda la fracción CD8<sup>+</sup>. Las células se centrifugan a 490xg por 5 min, se retira el sobrenadante, y se agregan los sobrenadantes que contienen los mAb anti-CD4 o anti-CD8 en cada caso. Se utilizan 100 $\mu$ l de sobrenadante/10<sup>6</sup> células y se incuban 10 min en agitación a 4°C. Al terminar la incubación las células se lavan con al menos 10 volúmenes de buffer de separación. Se resuspenden 10<sup>7</sup> células en 80 $\mu$ l de buffer de separación, se agregan 20 $\mu$ l del anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a perlas magnéticas (GAM-MACS, Miltenyi Biotec, Auburn CA) y se incuban 15 min en agitación a 4°C. Finalmente, se lavan las células una vez más con 10 volúmenes de buffer de separación y se resuspenden en 500  $\mu$ l del mismo buffer. Las células se mantienen a 4°C mientras se preparan las columnas de separación.

## **2.2.3 Separación magnética**

Se coloca la columna de separación magnética (High Gradient, MS, Miltenyi Biotec) en el imán del separador magnético y se equilibra con 500 $\mu$ l de buffer de separación. Posteriormente se agrega la suspensión celular marcada con el anticuerpo OKT4 y se hacen tres lavados con buffer de separación utilizando 500  $\mu$ l cada vez. La suspensión celular eluída corresponde a la fracción CD4<sup>+</sup>. La fracción CD4<sup>+</sup> se colecta retirando la columna del imán, agregando 2 ml de buffer y aplicando presión con el émbolo que acompaña a la columna. Se repite la operación con una columna nueva para separar las células marcadas con el anticuerpo OKT8. Una vez separadas las células, se cuentan todas las fracciones. Las fracciones negativas se irradian (3000 rads) para usarlas como células accesorias. Si las células de las fracciones positivas se van a teñir con CFSE se deben lavar dos veces con 10ml de DPBS antes de seguir el protocolo de tinción (3.4). Si se van a sembrar sin ninguna tinción previa se centrifugan a 490xg por 5 min y se resuspenden en RPMI completo, se cuentan y se siembran.

### **3 Citometría de flujo**

#### ***3.1 Citómetro de flujo***

El citómetro de flujo utilizado fue un FACScan (Becton Dickinson San Diego CA) equipado con un láser de argón de 488 nm. El CFSE y FITC se detectan en el canal FL-1; el yoduro de propidio y PE se detectan en el canal FL-2, y las fluorescencias del Cy-chrome y TC se detectan en el canal FL-3. Se utilizó el programa Cell Quest (Becton Dickinson) para análisis de los datos. Los linfocitos y los blastos fueron identificados por sus características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC).

#### ***3.2 Inmunofluorescencias***

##### **3.2.1 Soluciones**

- ✓ Buffer de lavado: DPBS +SFB (1%)+NaN<sub>3</sub> (0.1%)

##### **Anticuerpos**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución a usar</b>
Cabra anti ratón-FITC (Caltag)	1:1000
Cabra anti ratón-PE (Caltag)	1:800
Cabra anti ratón-TC (Zymed)	1:400
Ratón anti humano CD25-CY-CHROME (BD Pharmingen)	10 $\mu$ l / 10 <sup>6</sup> células
Ratón anti humano CD69-FITC (BD Pharmingen)	10 $\mu$ l / 10 <sup>6</sup> células

##### **3.2.2 Inmunofluorescencia directa**

Quinientas mil células se lavan con buffer de lavado y se resuspenden en el anticuerpo a utilizar diluido en buffer de lavado. Se incuban durante 30 min a 4°C en la obscuridad. Se lavan tres veces con 3 ml de buffer de lavado cada una y se resuspenden en 500 $\mu$ l de DPBS. Las células se analizan en el citómetro capturando 10<sup>4</sup> eventos.

##### **3.2.3 Inmunofluorescencia indirecta**

Quinientas mil células se lavan una vez con buffer de lavado y se resuspenden en 100 $\mu$ l de sobrenadante del hibridoma correspondiente y se incuban durante 30 min a 4°C. Se lavan tres veces con 3ml de buffer de lavado cada vez, se agregan 100 $\mu$ l del segundo anticuerpo acoplado a

un fluorocromo diluido en buffer de lavado y se incuban por 30 min a 4°C en obscuridad. Se lavan las células tres veces con 3 ml de buffer de lavado cada vez y se resuspenden en 500µl de DPBS. Las células se analizan en el citómetro capturando 10<sup>4</sup> eventos.

### ***3.3 Determinación de la proliferación por tinción con CFSE***

#### **3.3.1 CFSE (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)**

El colorante CFSE (Molecular Probes) se diluye en DMSO (Sigma) a una concentración de 5mM. Se guarda en alícuotas de 10µl a -20° C y al vacío. Las alícuotas se utilizan sólo una vez.

Las células se resuspenden a una concentración máxima de 5x10<sup>7</sup> células/ml y se tiñen con CFSE a una concentración final de 5µM durante 7 min, en baño a 37°C, protegidas de la luz y agitando ocasionalmente. Se detiene la incubación agregando 5 volúmenes de RPMI completo y se centrifugan por 5 min a 490xg. Las células se resuspenden en RPMI completo y se cuentan. Es importante que las células que se van a teñir no hayan estado en contacto con medio completo o soluciones con proteínas en caso de ser así se deben lavar con al menos diez volúmenes de DPBS dos veces para obtener una tinción adecuada.

#### **3.3.2 Ensayo de proliferación**

Se colocan un millón de células teñidas con CFSE en cada pozo de una placa de 24 pozos en 1ml de RPMI completo, conteniendo NaAsO<sub>2</sub> a concentraciones de 0 a 5 µM (concentración final) y se incuban 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Se agrega 1 ml de la concentración de NaAsO<sub>2</sub> correspondiente y 10µl de PHA del stock. Se incuban durante 96 h a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se cosechan, se lavan dos veces con 3 ml de DPBS cada vez, se resuspenden a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml en DPBS y se analizan en el citómetro en el canal FL-1 capturando 2x10<sup>4</sup> eventos. Si el ensayo es con células separadas, se tiñen únicamente las fracciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Se colocan 5x10<sup>5</sup> células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en cada pozo con 5x10<sup>5</sup> células CD4<sup>-</sup> o CD8<sup>-</sup> (irradiadas) respectivamente y se prosigue del mismo modo.

### **3.4 Determinación de células apoptóticas y del ciclo celular**

Todas las soluciones se deben de esterilizar en el autoclave o ser preparadas con agua estéril para eliminar DNAsas.

- ✓ PBS (NaCl 154 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 mM)
- ✓ Buffer de extracción DNA de bajo peso molecular: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M y ácido cítrico 0.1 M. Se conserva a 4°C.
- ✓ Solución de marcado con PI: PBS + Triton X-100 0.1%+ 0.2 mg/ml RNasa +0.02mg/ml PI. Preparar en fresco.

Las células se cosechan y se lavan una vez con PBS. Se resuspenden perfectamente de uno a cinco millones de células en 500µl de PBS para evitar la formación de cúmulos y se mezclan con 4.5 ml de etanol a 4°C en tubos de polipropileno por al menos dos h. Se pueden mantener las muestras a 4°C por varias semanas. Las células fijadas se centrifugan durante 5 min a 200xg, se decanta el etanol y se agrega 1ml de buffer de extracción de DNA de bajo peso molecular. Los tubos se tapan y se incuban en un baño a 37°C en agitación por 2 h. Las células se centrifugan a 1500xg, se decanta el sobrenadante, se resuspenden a una concentración de 10<sup>6</sup> células /ml en solución de marcado con PI y se incuban por 30 min a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se analizan inmediatamente en el citómetro de flujo en el canal FL-2 capturando 10<sup>4</sup> eventos. Estas muestras se analizaron con el programa Mod Fit LT (Verity software).

## **4 Estadística**

El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 3.0 de GraphPad Software, Inc. Para determinar diferencias significativas entre dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student con un intervalo de confianza del 95%. Para comparar tres o más grupos se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% y una post-prueba de tendencia lineal, en los que se indica el valor de la pendiente (*m*). En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos todos los valores  $p < 0.05$ .

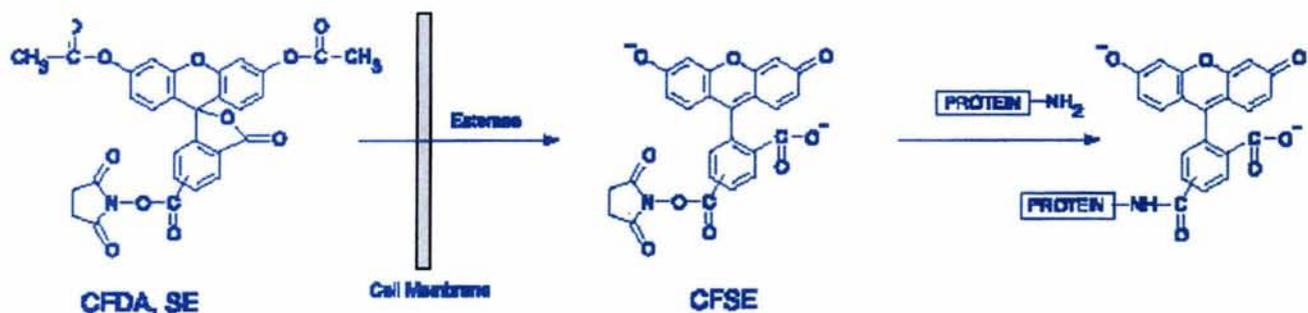
## **IV Resultados**

### **1 Análisis del efecto del NaAsO<sub>2</sub> en PBMC humanos**

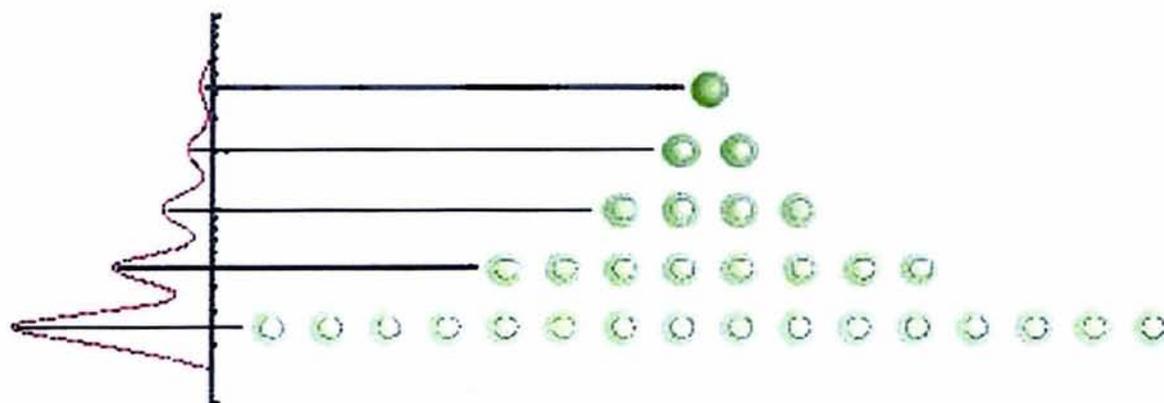
#### ***1.1 Montaje de la tinción de PBMC con el colorante CFSE***

Se ha reportado que el NaAsO<sub>2</sub> inhibe la proliferación de linfocitos T humanos al estimularlos con PHA *in vitro* [56,58,59]. Tradicionalmente, se utilizan los ensayos de incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina para medir la proliferación celular, sin embargo este método cuantifica únicamente la proliferación que se ha llevado a cabo durante el tiempo que dura el pulso con [<sup>3</sup>H]-Timidina, es decir cuantifica únicamente las últimas divisiones.

Una alternativa al método de incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina es el uso del colorante CFSE (carboxyfluoresceine diacetate succinimidyl ester). El CFSE (Fig. 10A) es una molécula no fluorescente y permeable a la membrana celular, por lo que entra a las células por difusión simple. Una vez en el citoplasma, las esterasas intracelulares remueven los grupos acetato de la molécula transformándola en una molécula [107] impermeable a la membrana celular y fluorescente, con características espectrales iguales a las de la fluoresceína. Además, el residuo succinimidil ester reacciona con las cadenas laterales de lisina o con cualquier grupo amino libre de las proteínas intracelulares de manera espontánea e irreversible, por lo que la célula se torna fluorescente. Cuando la célula se divide, cada una de las células hijas recibe la mitad de la fluorescencia; cada división subsecuente se acompaña de la pérdida de la mitad de la fluorescencia de la generación anterior y estas distribuciones secuenciales pueden ser seguidas fácilmente en un citómetro de flujo (Fig 10B). Finalmente, esta tinción es estable y duradera [107].



**A**



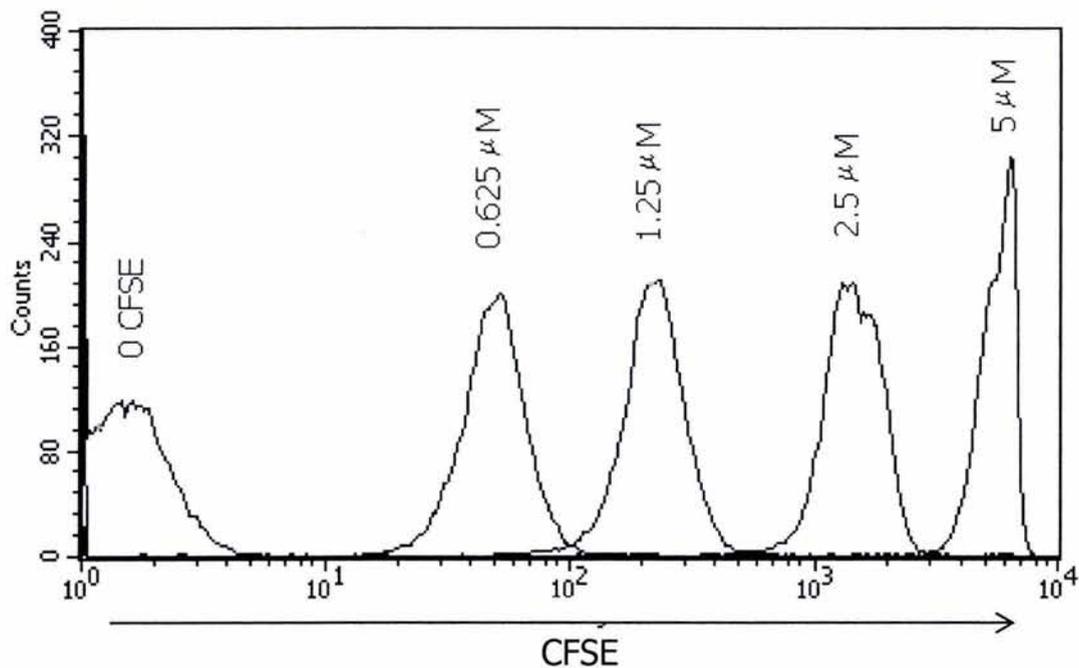
**B**

**FIG. 9 MECANISMO MOLECULAR DEL MARCAJE CON CFSE (A) Y ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO (B)[108]**

Dadas las ventajas de esta técnica, decidimos montarla para determinar el efecto del NaAsO<sub>2</sub> en la proliferación de linfocitos T. Basándonos en el protocolo descrito por Lyons [107] determinamos primero las condiciones óptimas de los factores involucrados en la obtención de una tinción adecuada, como son la concentración de CFSE para teñir los linfocitos y el tiempo de estimulación con PHA necesario para observar el mayor número de divisiones con la mejor resolución.

Para un análisis apropiado de la proliferación utilizando CFSE, lo más importante es 1) teñir las células homogéneamente, pues esto garantiza que se detecte sólo un pico de fluorescencia inicial en el citómetro y que cada una de las divisiones se detecte con picos definidos, y 2), que la intensidad de fluorescencia de las células teñidas sea tal que se puedan detectar todos los picos subsiguientes que aparecen como resultado de la proliferación. Para satisfacer estas dos

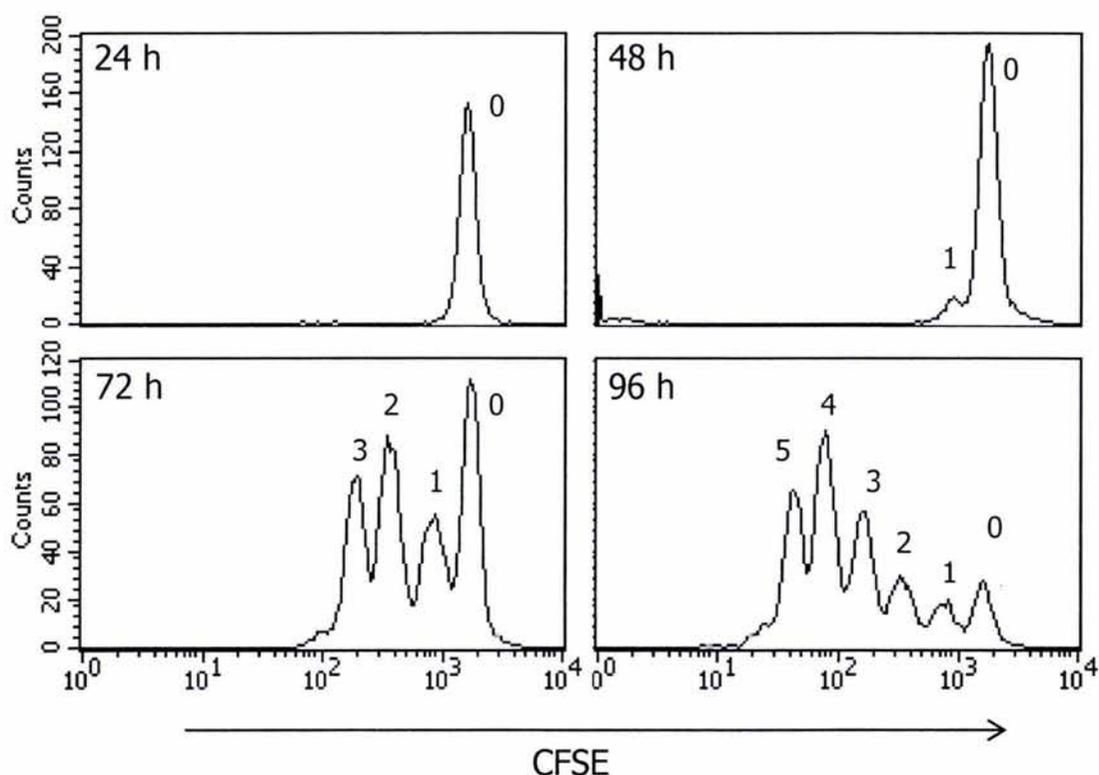
condiciones primero se determinó la concentración óptima de CFSE. Para tal fin se utilizaron PBMC humanos recién obtenidos, se tiñeron con diferentes concentraciones de CFSE (0.625-5 $\mu$ M) y se analizaron en el citómetro inmediatamente después de la tinción. Como se puede observar en la Fig. 11 las células sin teñir no muestran fluorescencia, mientras que las células teñidas con CFSE muestran una intensidad de fluorescencia directamente proporcional a la concentración de CFSE utilizada. Con estos experimentos se concluye que la mayor fluorescencia se obtiene al teñir los PBMC con una concentración de 5 $\mu$ M de CFSE.



**FIG. 10 TINCIÓN DE PBMC CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CFSE.** Las PBMC fueron teñidas con diferentes concentraciones de CFSE y fueron analizadas inmediatamente en el FACS. La región de los linfocitos se definió por características de tamaño (FSC-H) vs granularidad (SSC-H) y posteriormente se analizó la fluorescencia del CFSE.

Con el fin de determinar si la tinción que se obtuvo era duradera y en que tiempo después de la estimulación se detectaba la mayor cantidad de picos de proliferación, se sembraron las células teñidas con 5 $\mu$ M de CFSE, se estimularon con PHA, se cosecharon y se analizaron en el citómetro a diferentes tiempos (24-96h). En la Fig. 12 se observa que las células estimuladas por 24 h no han comenzado a dividirse, pues el único pico presente es el que corresponde a la tinción del 100% (0). En las células estimuladas por 48 h se encuentra un primer pico de división (1) cuya media de fluorescencia corresponde a la mitad de la media de fluorescencia del primer

pico. A las 72 h de estimulación las células están ya dividiéndose activamente pues se detectan claramente tres picos de división (1-3). Finalmente, a las 96 h post-estimulación se observan cinco picos de división bien definidos (1-5); en este momento el pico más fluorescente, que es el que corresponde a las células que no se dividieron, agrupa únicamente al 7% de la población, mientras que el mayor porcentaje de eventos se encuentra en el cuarto pico, lo cual indica que el 30% de la población se ha dividido cuatro veces. Así pues, se concluye que el tiempo post-estimulación en el que podemos detectar el mayor número de divisiones es a las 96 h.

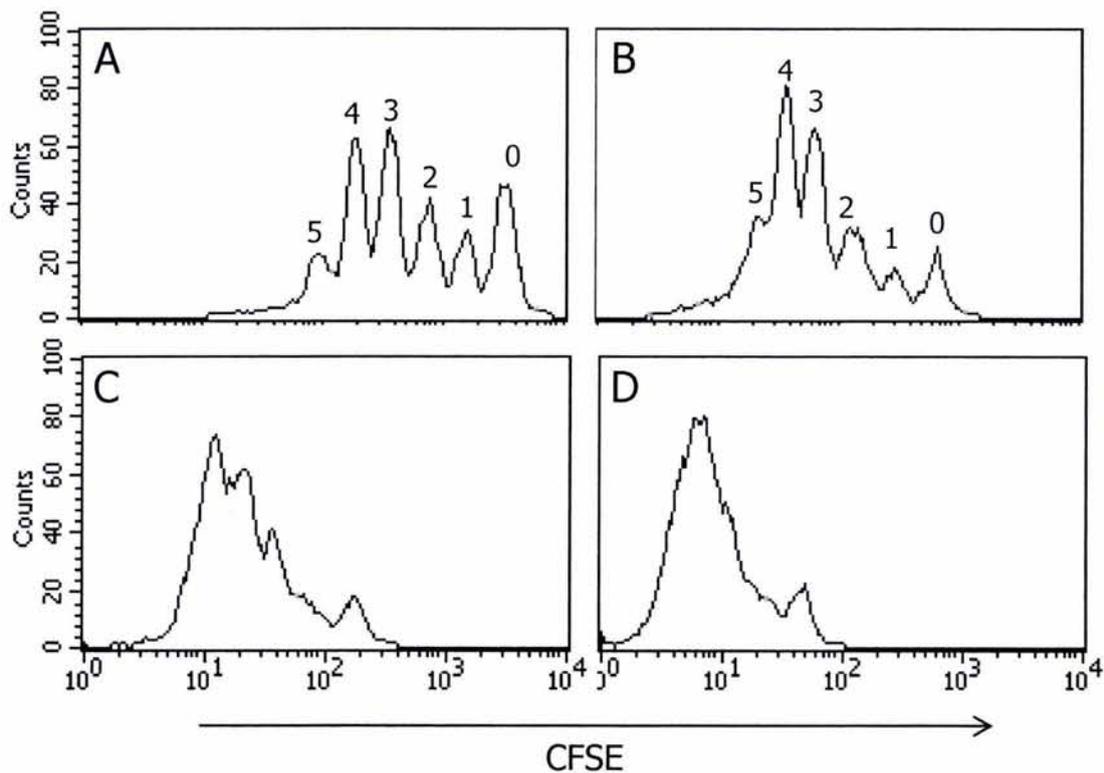


**FIG. 11 CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS TEÑIDOS CON 5 $\mu$ M DE CFSE.** Las PBMC fueron estimulados con PHA y fueron cosechados y analizados en el citómetro a las 24, 48, 72 y 96 h. El análisis de citometría se realizó como se describe en la Fig. 11.

Con el fin de determinar el efecto de la concentración de CFSE en la resolución del patrón de la proliferación se estimularon con PHA por 96 h las células teñidas con las concentraciones menores de CFSE (0.625-25 $\mu$ M). Se observa en la Fig. 13 que las células teñidas con 2.5  $\mu$ M de CFSE muestran los picos de división, sin embargo no podemos apreciar claramente la quinta división (5). En el caso de las células teñidas con 1.25  $\mu$ M observamos que no se pueden diferenciar de manera definida las divisiones, al igual que con las células teñidas con 0.625  $\mu$ M.

Estos datos muestran que usar concentraciones menores a  $5\mu\text{M}$  de CFSE tiene como resultado una menor resolución en el análisis de la proliferación celular.

Estos experimentos llevan a la conclusión de que la tinción óptima de linfocitos de sangre periférica humana se obtiene con una concentración final de CFSE de  $5\mu\text{M}$  y el análisis más apropiado de los resultados es cosechando y analizando las muestras a las 96 h de estimulación con PHA.

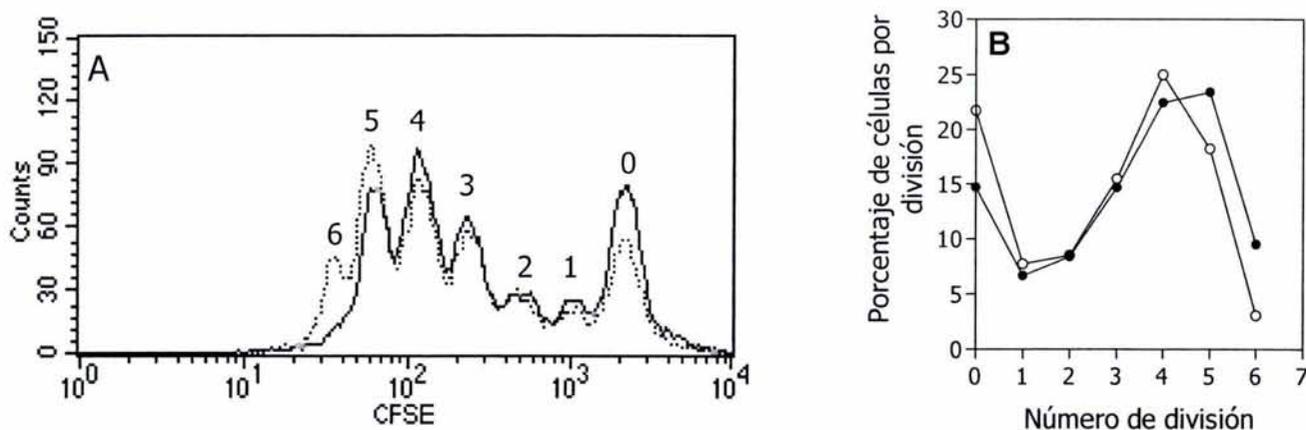


**FIG. 12** PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS TEÑIDOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CFSE. LAS CÉLULAS FUERON TEÑIDAS CON CFSE  $5\mu\text{M}$  (A),  $2.5\mu\text{M}$  (B),  $1.25\mu\text{M}$  (C) o  $0.625\mu\text{M}$  (D), FUERON ESTIMULADOS CON PHA POR 96H Y ANALIZADOS EN EL CITÓMETRO. EL ANÁLISIS DE CITOMETRÍA SE REALIZÓ COMO SE DESCRIBE EN LA FIG. 11.

### ***1.2 Efecto del $\text{NaAsO}_2$ sobre la proliferación de PBMC estimulados con PHA***

Una vez optimizada la técnica de proliferación por CFSE, se utilizó esta metodología para determinar el efecto de  $\text{NaAsO}_2$   $1\mu\text{M}$  en la proliferación de linfocitos T. Previamente se ha descrito

que el NaAsO<sub>2</sub> reduce la proliferación de linfocitos T en ensayos de incorporación [<sup>3</sup>H]-Timidina [56,58,59], por lo que al utilizar el colorante CFSE esperábamos obtener información más detallada respecto al efecto del As sobre la reducción en la proliferación de los linfocitos. En la Fig. 14A observamos que los linfocitos no expuestos a NaAsO<sub>2</sub> presentan seis divisiones (M2-M7), mientras que los linfocitos expuestos a 1μM de NaAsO<sub>2</sub> presentan cinco divisiones (M2-M6), lo cual indica que el NaAsO<sub>2</sub> reduce la proliferación de linfocitos estimulados con PHA. Al graficar el porcentaje de células en cada división (Fig. 14B) podemos observar que en los linfocitos estimulados sin NaAsO<sub>2</sub> el mayor porcentaje de eventos se encuentra en la quinta división (23.42%) y que un porcentaje pequeño (9.51%) llegó a dividirse hasta seis veces. En el caso de los linfocitos expuestos a NaAsO<sub>2</sub> el mayor número de eventos se encuentra en la cuarta división (24.99%) y aún cuando se logra una quinta división (18.24%) el porcentaje de linfocitos que alcanzan a dividirse por sexta vez es tres veces menor (3.1%) que en el caso de las células no expuestas. Estos resultados confirman la reducción en la proliferación antes mencionada, y sugieren que las células expuestas a NaAsO<sub>2</sub> capaces de dividirse lo hacen de una manera menos eficiente al compararlas con el control.



**FIG. 13 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TEÑIDAS CON CFSE Y EXPUESTAS A NaAsO<sub>2</sub>.** A) PBMC teñidos con CFSE estimulados con PHA por 96 h en presencia (—) o ausencia (...) de 1μM de NaAsO<sub>2</sub>. El análisis de citometría se realizó igual que en la Fig. 11. B) Porcentaje de linfocitos por división en presencia (○) o ausencia (●) de 1μM de NaAsO<sub>2</sub>.

Además, se observa en la Fig. 14A que en las células expuestas a NaAsO<sub>2</sub> existe un incremento en el número de eventos en el primer pico, correspondiente a las células que no se dividieron (0) en comparación con el control. El porcentaje de células que no se dividieron en el

control es de 14.71%, mientras que en las células expuestas a NaAsO<sub>2</sub> este valor corresponde al 21.73% (Fig. 14B). Estos datos demuestran que hay una acumulación de células que no se están dividiendo la cuales probablemente sean incapaces de entrar al ciclo celular.

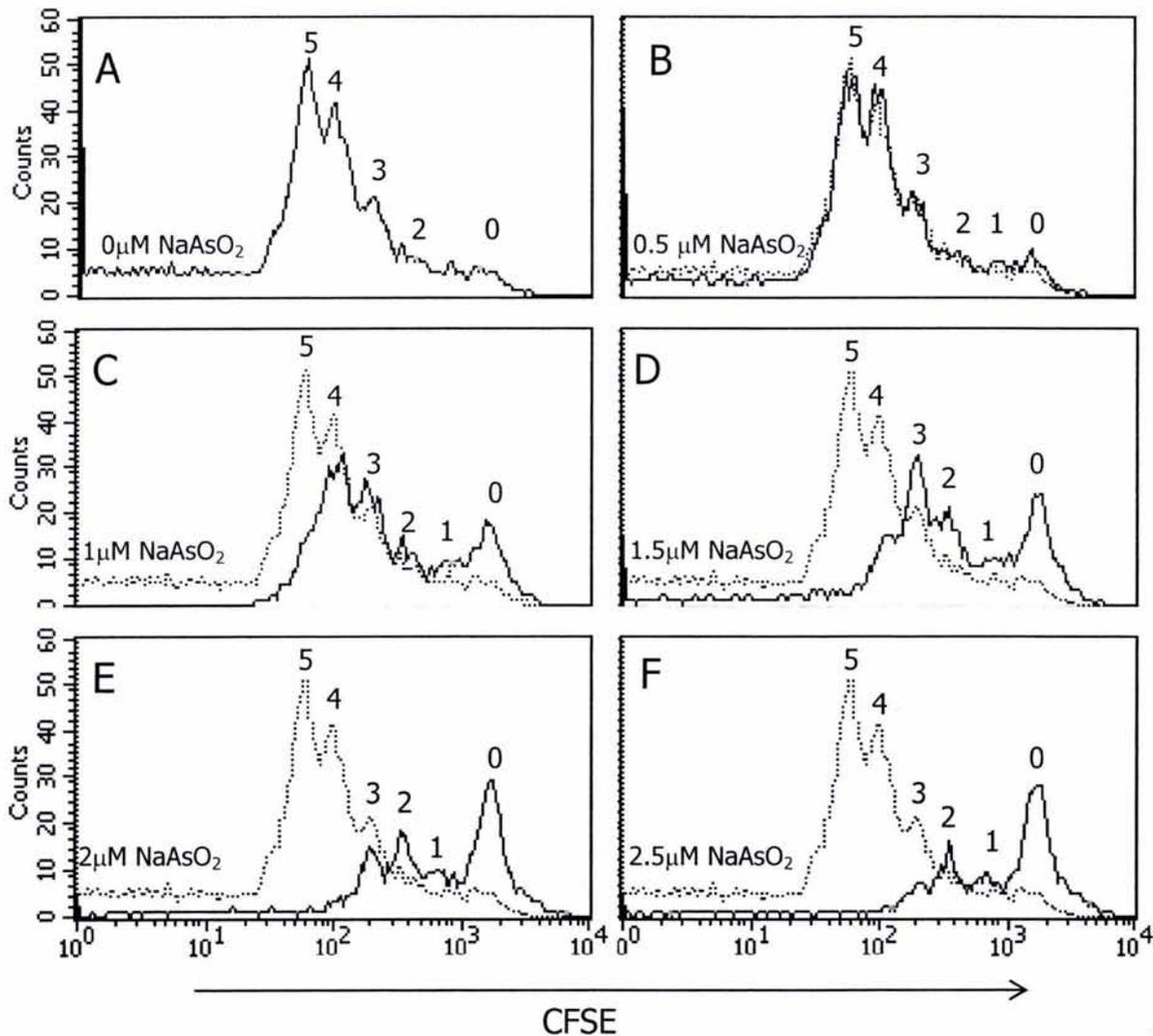
El experimento se repitió con 7 donadores diferentes y se calculó el porcentaje de la población inicial de células que fue capaz de dividirse (*divided cells*), de acuerdo a Lyons [109]. Como podemos observar en la Tabla 4, el promedio de células de la población original que se dividieron de los PBMC no expuestos es de 51.20%±17.43 mientras que el de los PBMC expuestos a 1µM de NaAsO<sub>2</sub> es de 42.07%±17.15, dando un porcentaje de reducción del 19.43%±10.20. Estos datos muestran que el NaAsO<sub>2</sub> reduce la proliferación de linfocitos T. Observamos además que el porcentaje de reducción de las células de la población original que se dividieron entre los donadores se encuentra en un rango muy amplio, pues estos valores van del 8% (Donador 1) al 34% (Donador 7) de reducción. Esta variabilidad posiblemente está relacionada con la sensibilidad individual al NaAsO<sub>2</sub>.

Donador	Porcentaje de las células de la población original que se dividieron		% de reducción
	0 µM NaAsO <sub>2</sub>	1µM NaAsO <sub>2</sub>	
1	43.37	40.11	8
2	69.77	61.08	12
3	76.43	65.86	14
4	55.53	46.63	16
5	39.35	31.75	19
6	26.58	17.79	33
7	47.40	31.29	34
<b>Promedio±SD</b>	<b>51.20±17.43*</b>	<b>*42.07±17.15</b>	<b>19.43±10.20</b>

**TABLA 4. PORCENTAJE DE LAS CÉLULAS DE LA POBLACIÓN ORIGINAL QUE SE DIVIDIERON DE PBMC ESTIMULADOS CON PHA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE NaAsO<sub>2</sub>.** Las células teñidas con CFSE fueron tratadas y analizadas como se menciona en la Fig. 11. El porcentaje de las células de la población original que se dividieron se calculó de acuerdo con Lyons [109]. El análisis estadístico que se utilizó fue la prueba *t* de Student con un intervalo de confianza del 95% \**p*=0.0007.

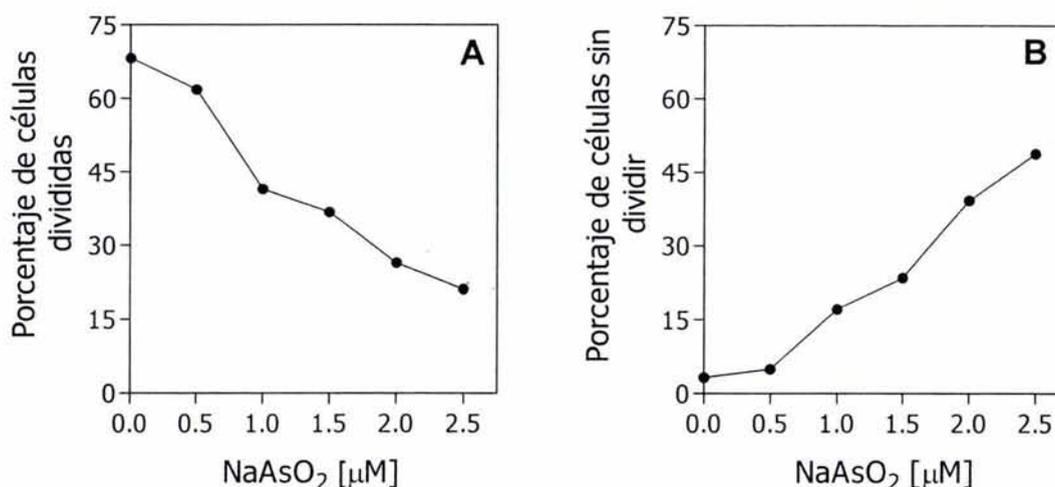
Con el objetivo de determinar si el efecto del NaAsO<sub>2</sub> en la proliferación de linfocitos T activados con PHA es dosis dependiente, se diseñó un experimento para analizar la proliferación celular utilizando el colorante CFSE y exponiendo las células a concentraciones crecientes de NaAsO<sub>2</sub> (0.5-2.5µM). Se observa en la Fig. 15A que los linfocitos estimulados sin exponer a NaAsO<sub>2</sub> se dividen cinco veces. En presencia de 0.5 µM de NaAsO<sub>2</sub> (Fig 15B) se observa un patrón

de división igual al de las células control, por lo que dicha concentración no tiene efecto alguno en la división de las células. Al incrementar la concentración de  $\text{NaAsO}_2$  a  $1\mu\text{M}$  (Fig. 15C) vemos que los linfocitos se dividen sólo cuatro veces. Esta reducción del número de divisiones aumenta conforme incrementamos la concentración de  $\text{NaAsO}_2$ , hasta llegar a  $2.5\mu\text{M}$  (Fig. 15 F), donde hay únicamente tres divisiones. Se concluye así que el  $\text{NaAsO}_2$  reduce la proliferación de linfocitos T activados con PHA de manera dosis dependiente.



**FIG. 14 CURVA DOSIS RESPUESTA DE  $\text{NaAsO}_2$  (0.5-2.5 $\mu\text{M}$ ) EN LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PHA.** Los PBMC fueron teñidos con CFSE e incubados 24h en ausencia (A) (.....) o presencia (\_\_\_) de  $\text{NaAsO}_2$  0.5 $\mu\text{M}$  (B), 1 $\mu\text{M}$  (C), 1.5 $\mu\text{M}$  (D), 2 $\mu\text{M}$  y 2.5 $\mu\text{M}$  (E). Posteriormente, fueron estimulados con PHA por 96h y analizados en el citómetro inmediatamente. La región de los linfocitos se definió por características FSC-H vs SSC-H y posteriormente se analizó la fluorescencia del CFSE.

Al analizar el porcentaje de células de la población original que se dividieron se observa (Fig 16 A) que en las células estimuladas sin  $\text{NaAsO}_2$  este valor corresponde al 68.24%, y disminuye de manera dosis dependiente hasta llegar al 21.09% en las células expuestas a  $2.5\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$ . Aunado a esto, en la Fig 16B se observa un incremento dosis dependiente de células sin dividir. Estos datos muestran que el  $\text{NaAsO}_2$  reduce el porcentaje de células divididas de manera dosis dependiente y que de manera paralela a esta reducción hay una acumulación de células que no se dividen.

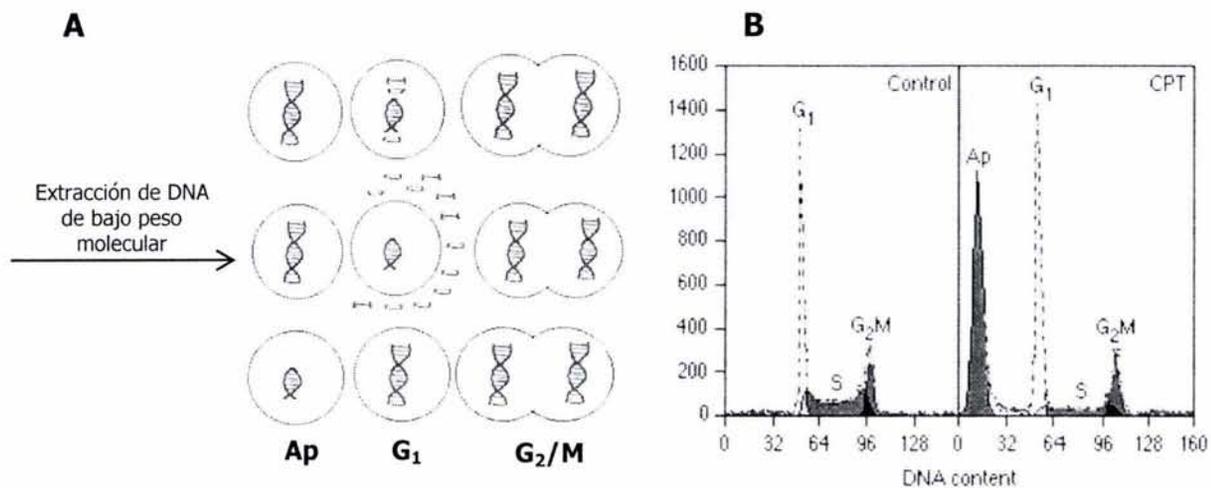


**FIG. 15 PORCENTAJE DE LAS CÉLULAS DE LA POBLACIÓN ORIGINAL QUE SE DIVIDIERON Y DE CÉLULAS SIN DIVIDIR.** Los datos obtenidos al analizar las células en el citómetro se utilizaron para calcular (A) el porcentaje de las células de la población original que se dividieron y (B) el porcentaje de células que no se dividieron.

### ***1.3 Ciclo celular y apoptosis de linfocitos expuestos a $\text{NaAsO}_2$***

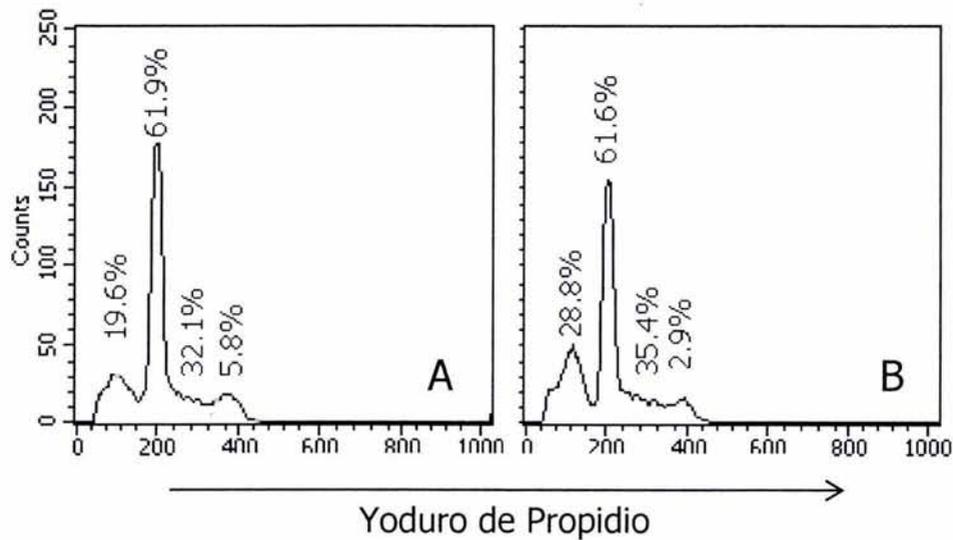
En incisos anteriores se demostró que el  $\text{NaAsO}_2$  reduce la proliferación de linfocitos T, y que esta reducción viene acompañada de una acumulación de células incapaces de dividirse. Con el fin de analizar el ciclo celular de los linfocitos estimulados en presencia del  $\text{NaAsO}_2$  se utilizó una técnica que determina el contenido de DNA por citometría de flujo y que cuenta con la ventaja de permitir identificar junto con las fases del ciclo celular el porcentaje de células apoptóticas presentes en la población analizada. Esta ventaja se basa en el hecho de que las células apoptóticas, entre muchos procesos (por ej. despolarización de la membrana mitocondrial, liberación de Bcl-2, activación de caspasas), sufren de una digestión parcial de su DNA nuclear. Al

utilizar esta técnica podemos eliminar todos los fragmentos pequeños de DNA producto de esta digestión (Fig. 18A). Después de esta eliminación, las células apoptóticas son fáciles de identificar en el citómetro de flujo, pues debido a su contenido de DNA, su media de fluorescencia es menor que el de una célula diploide. En el histograma de la Fig 18B [110] está representado el ciclo celular de una muestra control de células HeLa y una expuesta a camptotencina (CPT), que es un conocido inductor de apoptosis e inhibidor de la fase S. Podemos observar que en las células tratadas con CPT aparece un pico subdiploide (Ap) correspondiente a las células apoptóticas, al igual que una reducción en el porcentaje de células en el proceso de síntesis de DNA (S).



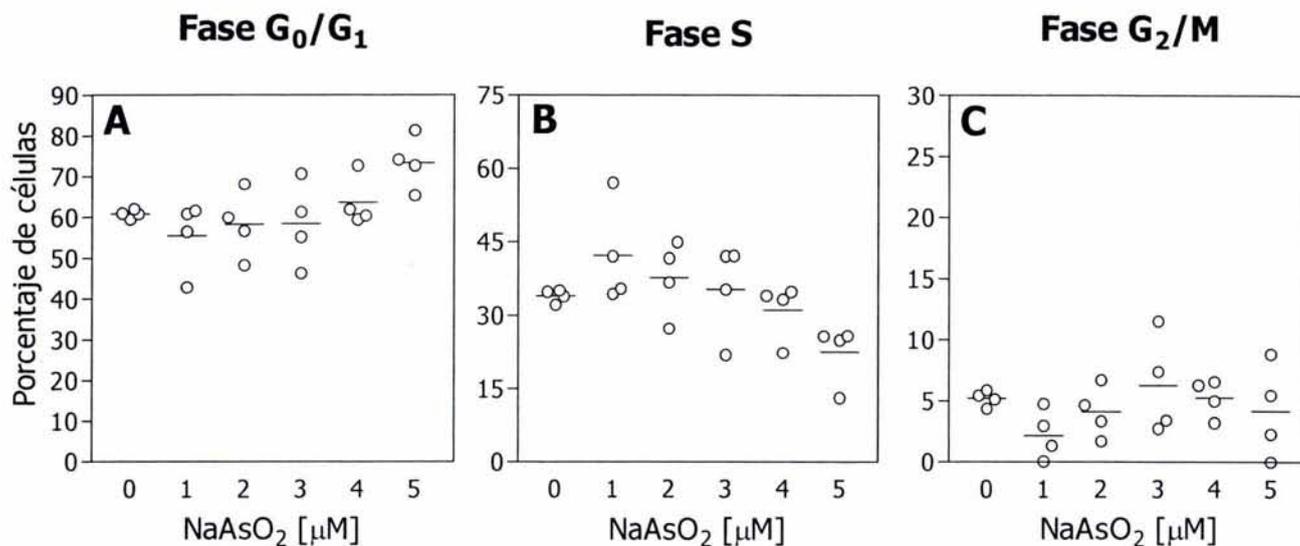
**FIG. 16 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS.** (A) Esquema de la función de la extracción de DNA de bajo peso molecular en el análisis del ciclo celular y apoptosis. (B) Histograma que representa el contenido de DNA en cada una de las fases del ciclo celular [110]

Al analizar las fases de ciclo celular y el porcentaje de células en apoptosis de PBMC tratados con NaAsO<sub>2</sub> se encontró (Fig. 19) que, tanto los linfocitos no expuestos (Fig. 19A) como expuestos a 1 $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> (Fig. 19B), mantienen proporciones semejantes en el porcentaje de células en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y S. Sin embargo, en las células expuestas a NaAsO<sub>2</sub> hay una reducción en el porcentaje de células en la fase G<sub>2</sub>/M, así como un incremento en el porcentaje de células apoptóticas (Ap). Esto sugiere que la exposición a NaAsO<sub>2</sub> reduce la capacidad de las células de dividirse, dada la reducción en el porcentaje de las células en G<sub>2</sub>/M, y tiene además un efecto apoptótico sobre las mismas.



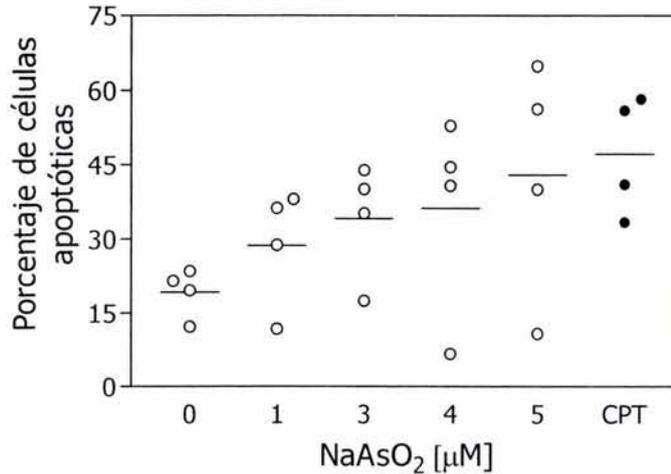
**FIG. 17 ANÁLISIS DE CICLO CELULAR Y APÓPTOSIS DE PBMC EXPUESTOS A NaAsO<sub>2</sub>.** Las células fueron incubadas en presencia (A) o ausencia (B) de NaAsO<sub>2</sub>, activadas con PHA, cosechadas a las 96 h y tratadas como se describe en material y métodos y capturadas es el citómetro inmediatamente. La cantidad de DNA se definió con los parámetros de FL2-A vs FL2-W y posteriormente se analizaron los datos en función de FL2-H. EL porcentaje de células en cada fase se obtuvo analizando los datos en el programa MODFIT LT.

Se realizó este experimento con cuatro donadores utilizando concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> de 1 a 5 μM. Primero, se analizó el ciclo celular y como podemos observar en la Fig. 20A, la media del porcentaje de células en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> se mantiene al exponer a las células a concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> de entre 1 y 4 μM, y se incrementa claramente con la exposición a 5 μM. El porcentaje de células en la fase S (Fig. 20B), se mantiene igualmente hasta la concentración de 4 μM de NaAsO<sub>2</sub> y disminuye significativamente al exponer los PBMC a 5 μM. Los porcentajes de las células en las fases G<sub>2</sub>/M (Fig. 20C), no muestran un comportamiento claro, lo cual es probablemente resultado de la dispersión entre los valores de los donadores que se ve incrementada por la escala tan pequeña en la que se grafican estos porcentajes. Estos resultados muestran que la reducción en la proliferación que observamos es en parte resultado de que el NaAsO<sub>2</sub> detiene a los linfocitos en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> evitando su entrada a la fase S y por lo tanto su oportunidad de dividirse.



**FIG. 18 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR DE PBMC EXPUESTOS A NaAsO<sub>2</sub> EN DIFERENTES DONADORES.** Las células de los diferentes donadores se trataron, capturaron y analizaron como se indica en la Fig. 19. Finalmente el porcentaje de células en cada fase se graficó para su comparación, cada círculo (o) representa a un donador. Los datos presentan una tendencia lineal estadísticamente significativa en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ( $m=1.250$ ,  $p=0.0018$ ) y en S ( $m=-1.335$ ,  $p=0.0013$ ) pero no en G<sub>2</sub>/M ( $m=0.08446$ ,  $p=0.6126$ ).

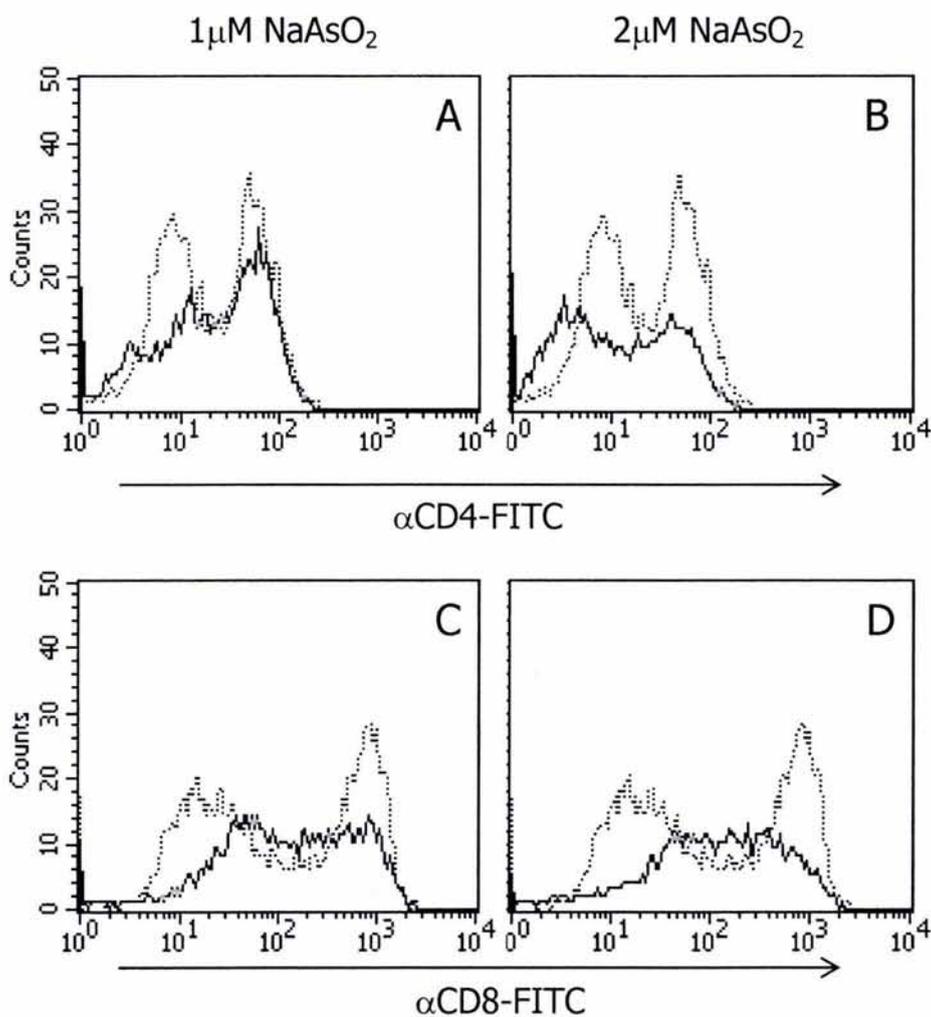
Paralelamente se analizó el porcentaje de células apoptóticas de estas muestras utilizando CPT como control positivo. En la Fig. 21 se muestra que el porcentaje de células apoptóticas se incrementa de manera dosis dependiente desde la exposición a la concentración más baja de NaAsO<sub>2</sub>. Se observa también que existe una dispersión muy amplia entre los valores de los donadores. Esto se relaciona con la sensibilidad individual al NaAsO<sub>2</sub> antes mencionada, sin embargo la tendencia a incrementar el porcentaje de células apoptóticas conforme se incrementa la concentración NaAsO<sub>2</sub> es clara. Estos datos muestran que el NaAsO<sub>2</sub> tiene un efecto inductor de apoptosis dosis dependiente en PBMC activados con PHA.



**FIG. 19 ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS DE PBMC EXPUESTOS A NaAsO<sub>2</sub> EN DIFERENTES DONADORES.** Las células de los diferentes donadores se trataron, capturaron y analizaron como se indica en la Fig. 19. Finalmente el porcentaje de células apoptóticas se graficó para su comparación, cada círculo (○) representa a un donador y como control positivo utilizamos células tratadas con CPT (●). Los datos presentan una tendencia lineal estadísticamente significativa ( $m=2.632$ ,  $p=0.005$ ).

#### ***1.4 Expresión de las moléculas CD4 y CD8 en linfocitos expuestos a NaAsO<sub>2</sub>***

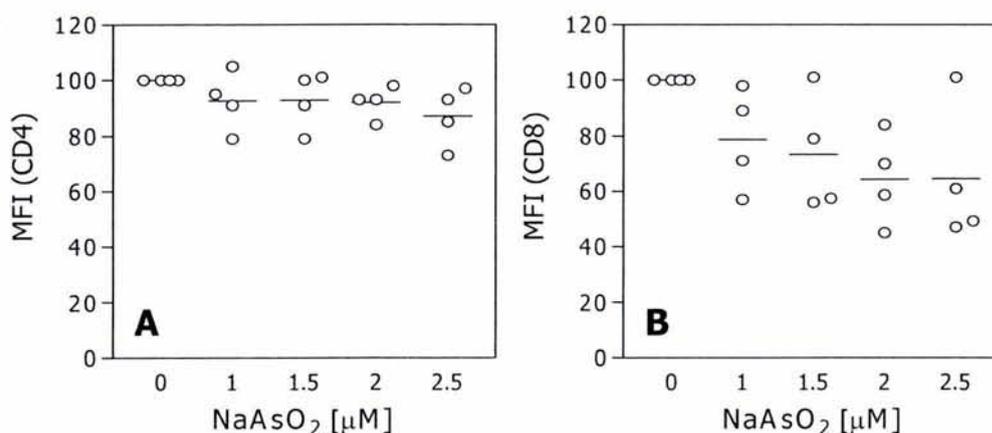
Dados los efectos del NaAsO<sub>2</sub> sobre la proliferación y ciclo celular de linfocitos T, se decidió analizar si el NaAsO<sub>2</sub> estaba afectando también moléculas importantes para los linfocitos T, como son los marcadores CD4 y CD8. Primero, se determinó el efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre la expresión de ambos marcadores. Para ello se incubaron linfocitos humanos con concentraciones crecientes de NaAsO<sub>2</sub> (1-2.5μM) por 24 h, posteriormente se estimularon con PHA y al término se analizó la expresión de los marcadores CD4 y CD8 por inmunofluorescencia. Se observa en la Fig. 22 que al exponer a los PBMC a 1μM de NaAsO<sub>2</sub> no se altera la intensidad media de fluorescencia (MFI) del marcador CD4 ni del CD8, pero hay una disminución en la expresión de ambos marcadores al exponer las células a 2μM NaAsO<sub>2</sub> (Fig. 22). Estos datos indican que el NaAsO<sub>2</sub> disminuye la expresión de los marcadores CD4 y CD8.



**FIG. 20 EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES CD4 Y CD8 EN PBMC ESTIMULADOS CON PHA EN PRESENCIA DE  $\text{NaAsO}_2$ .** Las células fueron incubadas en presencia (—) o ausencia (...) de  $\text{NaAsO}_2$  por 24 h estimuladas por 96h, fueron cosechadas y la inmunofluorescencia indirecta se realizó como se indica en material y métodos. Finalmente las células fueron analizadas en el citómetro. La región de los linfocitos se definió por características de tamaño (FSC-H) vs granularidad (SSC-H) y posteriormente se analizó la fluorescencia de los marcadores CD4 (A y B) y CD8 (C y D).

Posteriormente, se analizaron los resultados obtenidos con 4 donadores diferentes en una curva dosis respuesta de  $\text{NaAsO}_2$ . En la Fig. 23 A se muestra que el  $\text{NaAsO}_2$  reduce ligeramente la intensidad media de fluorescencia del marcador CD4, lo que indica que reduce la expresión de este marcador; este efecto es dosis dependiente y tiene una tendencia lineal estadísticamente significativa ( $m = -2.65$ ,  $p = 0.0256$ ). En la Fig. 23B se aprecia que el  $\text{NaAsO}_2$  también reduce la intensidad del marcador CD8, aunque de una manera más drástica que en el caso del CD4. Al igual que para el marcador CD4 este efecto es dosis dependiente y también tiene una tendencia

lineal estadísticamente significativa ( $p=0.0003$ ), sin embargo estos datos presentan una pendiente más pronunciada ( $m=-8.521$ ), lo que indica que el  $\text{NaAsO}_2$  reduce más la expresión del marcador CD8 que la del marcador CD4. Igualmente resulta importante mencionar la gran variabilidad que se encuentra entre los donadores al analizar la expresión del marcador CD8 (Fig. 23B) en comparación con la expresión del marcador CD4 (Fig. 23A). Estos datos muestran que el  $\text{NaAsO}_2$  reduce la expresión de los marcadores CD4 y CD8 en linfocitos humanos activados con PHA siendo el marcador CD8 más sensible a este efecto.



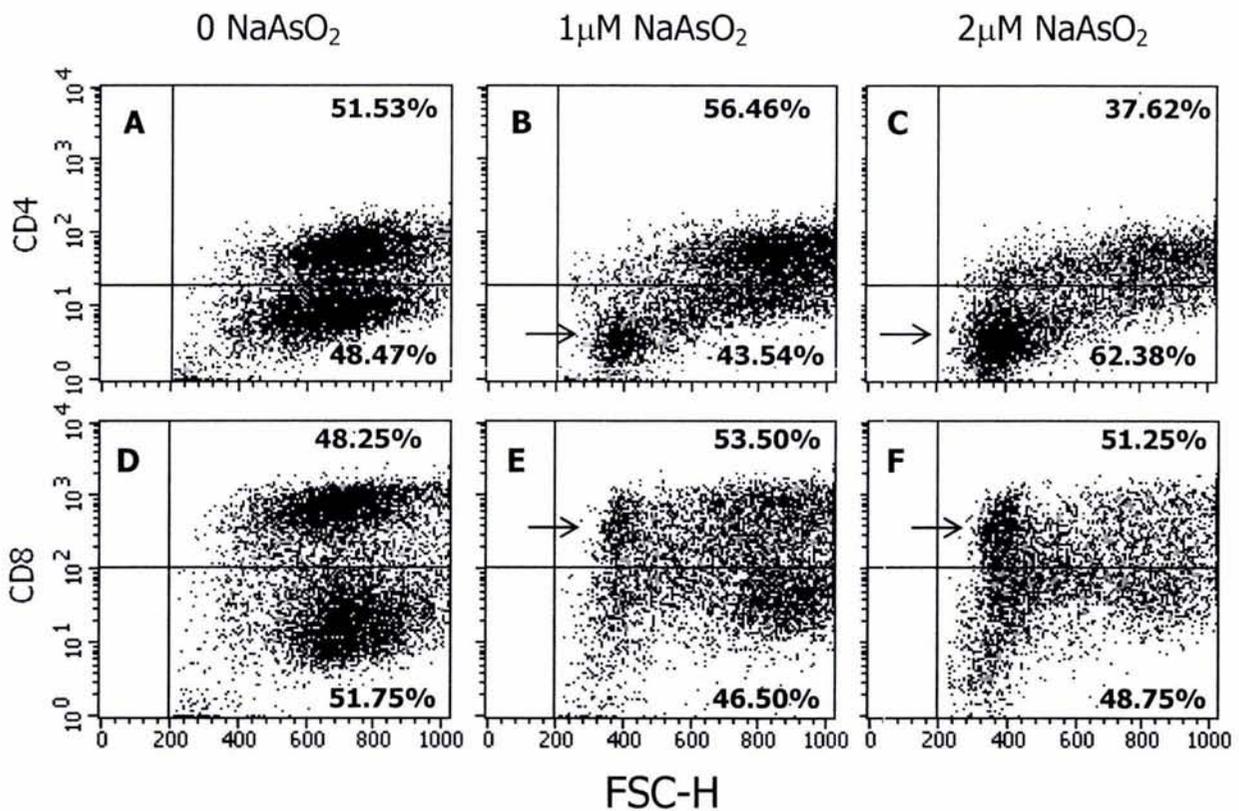
**FIG. 21 ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA DE LOS MARCADORES CD4 Y CD8 EN DIFERENTES DONADORES.** Las células fueron expuestas por 24h a  $\text{NaAsO}_2$  (1-5 $\mu\text{M}$ ), activadas con PHA por 96 h, tratadas y analizadas como se indica en la Fig. 22. Los datos fueron normalizados para su comparación y cada círculo (o) representa un donador. Los datos tienen una tendencia lineal estadísticamente significativa para el marcador CD4 ( $m= -2.65$ ,  $p=0.0256$ ) y para el marcador CD8 ( $m=-8.521$ ,  $p=0.0003$ ).

### **1.5 Transformación blástica de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expuestos a NaAsO<sub>2</sub>**

Con el fin de determinar si el  $\text{NaAsO}_2$  afectaba la capacidad de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> para transformarse en blastos se analizaron los experimentos del inciso anterior en función de los parámetros de fluorescencia y tamaño. Se observa en la Fig. 24A que en los linfocitos estimulados sin  $\text{NaAsO}_2$  el 51% de las células son positivas para el marcador CD4 y este porcentaje se mantiene al exponerlas a 1 $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  (Fig. 24B); sin embargo, al exponer las células a 2 $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  se reduce el porcentaje de células positivas 37.6%. Se observa también que al exponer las células a  $\text{NaAsO}_2$  (Fig. 24B y C) se acumula una población de menor tamaño y negativa para el marcador (flecha). Estos datos muestran la pérdida de la expresión del marcador reportada en el inciso anterior y sugiere que estas células son incapaces de transformarse a blastos (flecha). Al

analizar la expresión del marcador CD8 (Fig. 24 D-F) podemos observar que no hay cambios en el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> cuando son expuestas a 1 y 2 $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub>, pero se aprecia una acumulación de células CD8<sup>+</sup> que no incrementan de tamaño (blastos) . Esto demuestra que, si bien el NaAsO<sub>2</sub> no afecta el porcentaje de células CD8<sup>+</sup>, impide su capacidad de transformarse a blastos.

Estos datos sugieren que el efecto del NaAsO<sub>2</sub> en linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es diferente, ya que reduce la transformación blástica de ambas poblaciones y reduce la cantidad de células CD4<sup>+</sup> pero no la de células CD8<sup>+</sup>.

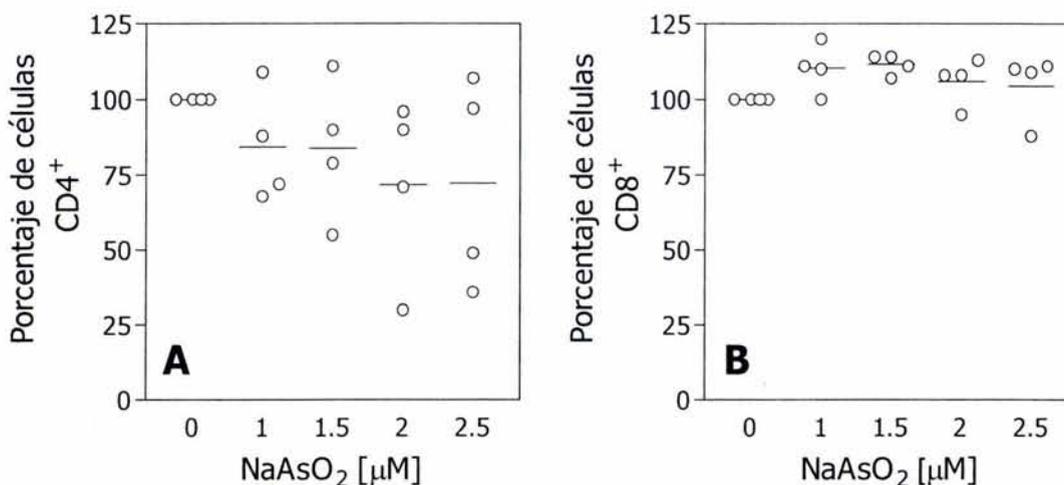


**FIG. 22 PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA LOS MARCADORES CD4 Y CD8 EN LINFOCITOS EXPUESTOS A NaAsO<sub>2</sub>.** Las PBMC fueron incubadas en ausencia o presencia de NaAsO<sub>2</sub> por 24 h, estimuladas con PHA por 96 h y tratadas como se indica en la Fig.22. La región de los linfocitos se definió por características de tamaño (FSC-H) vs granularidad (SSC-H) y posteriormente se analizó la fluorescencia de cada marcador (CD4 o CD8) vs FSC-H para distinguir los blastos.

Se comparó el porcentaje de células positivas para cada marcador en cuatro donadores diferentes. En la Fig.25A se observa que el NaAsO<sub>2</sub> reduce el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> de

manera significativa al aumentar la concentración de  $\text{NaAsO}_2$  ( $m=-6.800$ ,  $p=0.0407$ ), pero no afecta el porcentaje de células  $\text{CD8}^+$  (Fig. 25B) ( $m=0.475$ ,  $p=0.6251$ ). Finalmente, resulta evidente la heterogeneidad entre los donadores (mayor en los linfocitos  $\text{CD4}^+$  que en los  $\text{CD8}^+$ ).

Todos estos datos confirman que el  $\text{NaAsO}_2$  tiene efectos diferentes en las subpoblaciones  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ , y también sugieren que el daño por la exposición a  $\text{NaAsO}_2$  para cada una de estas subpoblaciones depende en gran medida de la sensibilidad del donador.



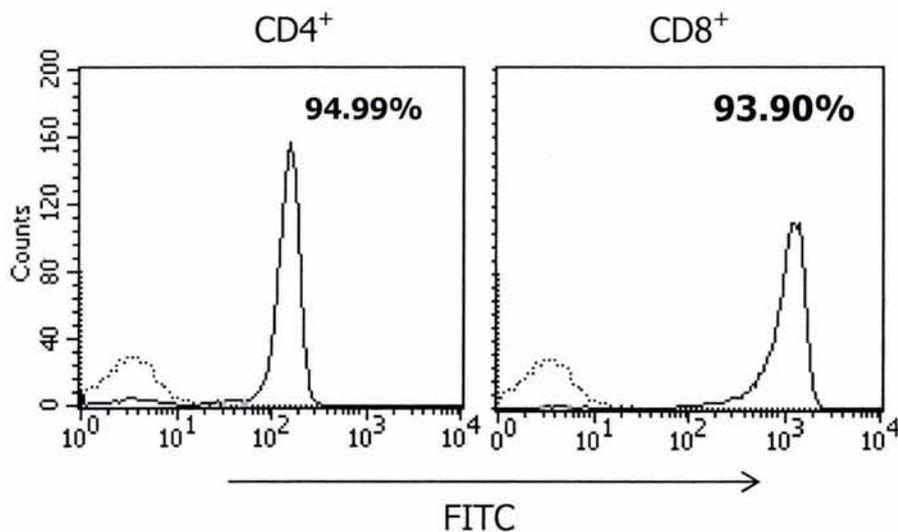
**FIG. 23 ANÁLISIS DEL PORCANTAJE DE CÉLULAS QUE EXPRESAN LOS MARCADORES CD4 Y CD8 EN DIFERENTES DONADORES.** Las células fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{NaAsO}_2$  (1-5 $\mu\text{M}$ ) por 24 h y activadas con PHA por 96 h; fueron tratadas y analizadas como se describe en la Fig. 24. Posteriormente los datos fueron normalizados para su comparación, cada círculo ( $\circ$ ) representa un donador. Los datos tienen una tendencia lineal estadísticamente significativa para el porcentaje de células  $\text{CD4}^+$  ( $m=-6.800$ ,  $p=0.0407$ ) pero no para el porcentaje de las células  $\text{CD8}^+$  ( $m=0.475$ ,  $p=0.6251$ )

## **2 Análisis del efecto del $\text{NaAsO}_2$ en las poblaciones $\text{CD4}^+$ y $\text{CD8}^+$**

En los experimentos anteriores demostramos que el  $\text{NaAsO}_2$  reduce la transformación blástica de las poblaciones  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ , sin embargo, a diferencia de los linfocitos  $\text{CD8}^+$ , los  $\text{CD4}^+$  pierden la expresión del marcador. Esto sugiere que el  $\text{NaAsO}_2$  podría afectar de manera diferente

a estas poblaciones. Para resolver esta cuestión se analizó la proliferación, ciclo celular y apoptosis de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de manera independiente.

Se obtuvieron PBMC humanos, y se purificaron los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por selección magnética positiva. La pureza de las dos fracciones fue analizada por inmunofluorescencia indirecta. Como se puede observar en la Fig. 26, ambas poblaciones presentaron una pureza >90%.



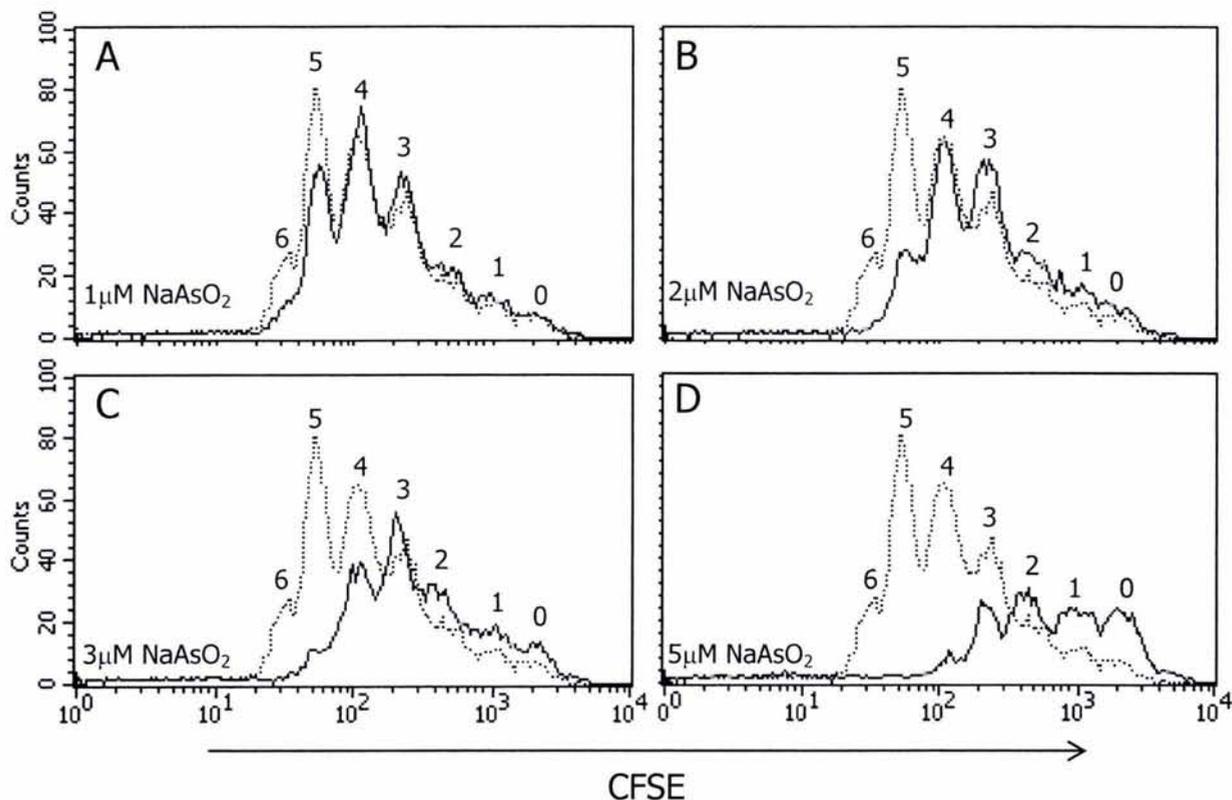
**FIG. 24 PUREZA DE LAS POBLACIONES CD4<sup>+</sup> Y CD8<sup>+</sup> SEPARADAS POR SELECCIÓN MAGNÉTICA POSITIVA.** Los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron separadas por selección magnética positiva e incubadas con el anticuerpo GAM-FITC y fueron capturadas en el citómetro inmediatamente. La región de los linfocitos se definió por características de FSC-H vs SSC-H y posteriormente se analizó la fluorescencia FITC.

### ***2.1 Ensayos de proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> utilizando el colorante CFSE***

Con el objetivo de determinar si el NaAsO<sub>2</sub> afecta de manera diferente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos activados con PHA, se tiñeron con el colorante CFSE los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> separados, se sembraron en presencia o ausencia de NaAsO<sub>2</sub> y se analizó la proliferación por citometría de flujo.

En la Fig. 27A se observa que los linfocitos CD4<sup>+</sup> estimulados sin NaAsO<sub>2</sub> se dividieron seis veces, a diferencia de los expuestos a 1 μM de NaAsO<sub>2</sub>, los cuales se dividieron cinco veces. Esta

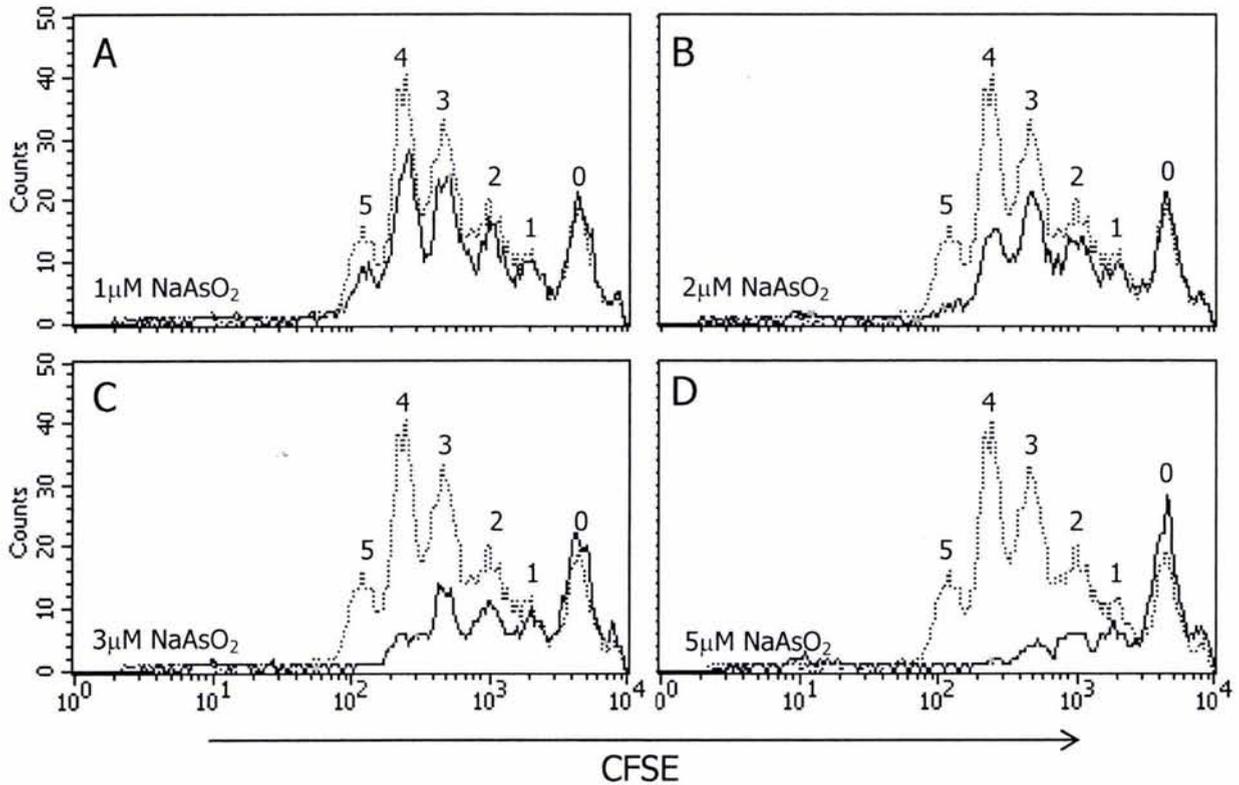
reducción en el número de divisiones se incrementa de manera dosis dependiente hasta llegar a la exposición de  $5\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  (Fig. 27D), en la cual los linfocitos  $\text{CD4}^+$  se dividieron únicamente tres veces, lo cual demuestra que el  $\text{NaAsO}_2$  reduce la proliferación de los linfocitos  $\text{CD4}^+$ .



**FIG. 25 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS  $\text{CD4}^+$**  Una vez separados, los linfocitos fueron teñidos con el colorante CFSE, fueron incubados por 24h en ausencia (.....) o presencia de diferentes concentraciones de  $\text{NaAsO}_2$  (\_\_\_), y posteriormente fueron estimulados con PHA por 96 h. Finalmente, se cosecharon y se analizaron en el citómetro inmediatamente. La región de los linfocitos se definió por características FSC-H vs SSC-H y posteriormente se analizó la fluorescencia del CFSE.

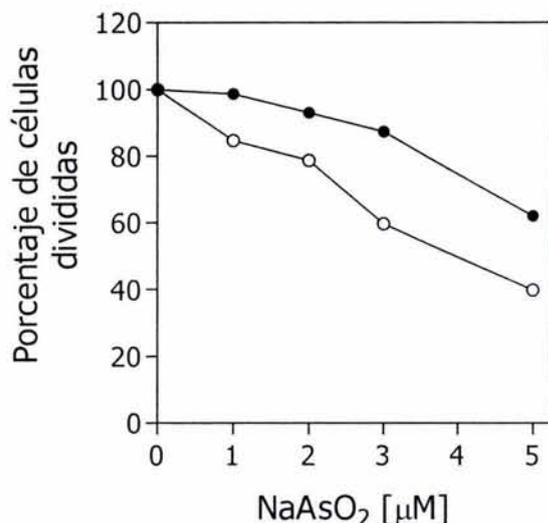
Paralelamente, se observa en la Fig. 28A que los linfocitos  $\text{CD8}^+$  estimulados sin  $\text{NaAsO}_2$  se dividen cinco veces y al exponerlos a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  (Fig. 28B) las células se dividen también cinco veces, sin embargo podemos apreciar que hay una reducción en el número de células de las últimas tres divisiones en comparación con el control. Al exponer los linfocitos  $\text{CD8}^+$  a  $2\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  (Fig. 28B) se observa que hay sólo cuatro divisiones y que el número de células de las últimas tres divisiones sigue siendo menor en comparación con el control. Los efectos antes mencionados se ven incrementados de manera dosis dependiente hasta la concentración de  $5\mu\text{M}$ , en la cual se pone en evidencia que los linfocitos  $\text{CD8}^+$  se dividen únicamente tres veces, y que el

número de células en cada una de estas divisiones es mucho menor en comparación con el control. Estos datos demuestran que además de reducir el número de divisiones de los linfocitos CD8<sup>+</sup>, el NaAsO<sub>2</sub> también reduce la cantidad de células en cada una de las divisiones.



**FIG. 26 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS CD8<sup>+</sup>** Las células se incubaron, activaron y analizaron al igual que en la Fig. 27, en ausencia (.....) o presencia (\_\_\_) de diferentes concentraciones de NaAsO<sub>2</sub>.

El análisis de los porcentajes de las células de la población original que se dividieron en cada condición muestra que para ambas poblaciones dicho porcentaje disminuye de manera dosis dependiente (Fig. 29), siendo esta reducción siempre mayor en los linfocitos CD8<sup>+</sup>. Estos datos muestran que el efecto que tiene el NaAsO<sub>2</sub> de reducir el porcentaje de la población inicial capaz de dividirse es mayor en los CD8<sup>+</sup> que en los CD4<sup>+</sup>.



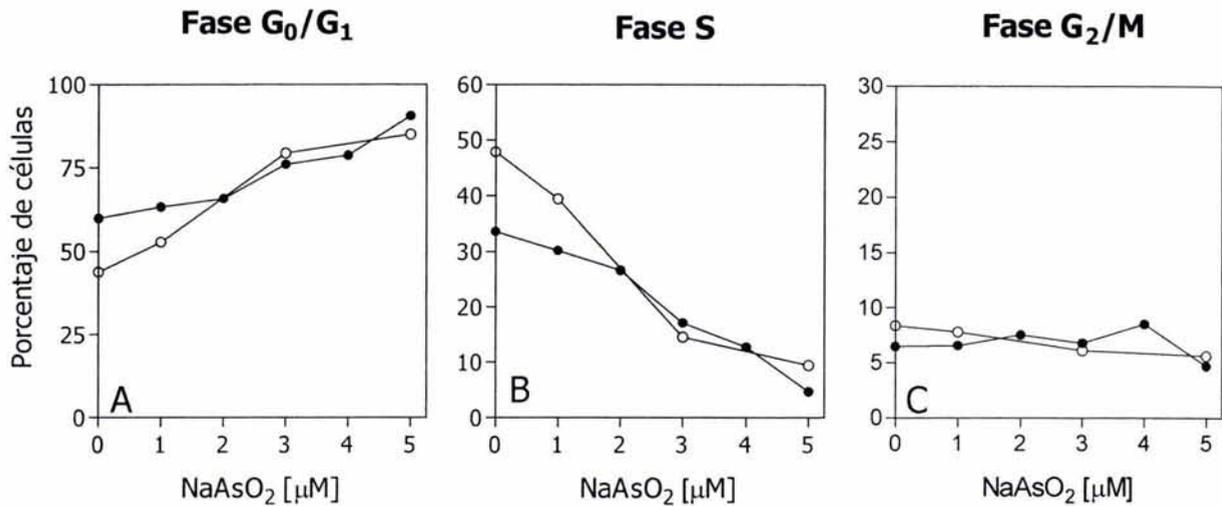
**FIG. 27 PORCENTAJE DE CÉLULAS DIVIDIDAS DE LINFOCITOS EXPUESTOS A NAASO<sub>2</sub>.** Los datos obtenidos de la proliferación con CFSE de linfocitos CD4<sup>+</sup> (●) y CD8<sup>+</sup> (○) se analizaron para obtener el porcentaje de *células divididas* de acuerdo a Lyons [109].

Se concluye con estos experimentos que el NaAsO<sub>2</sub> reduce la cantidad de divisiones tanto de los linfocitos CD4<sup>+</sup> como de los linfocitos CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, también muestran que los linfocitos CD8<sup>+</sup> son más sensibles al efecto del NaAsO<sub>2</sub> debido a que la cantidad de células que observamos en cada división se reduce mucho más que en los CD4<sup>+</sup>, así mismo, la cantidad de células de la población original que se dividieron es menor en los CD8<sup>+</sup> que en los CD4<sup>+</sup>.

## ***2.2 Análisis del ciclo celular y apoptosis de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expuestos a NaAsO<sub>2</sub>***

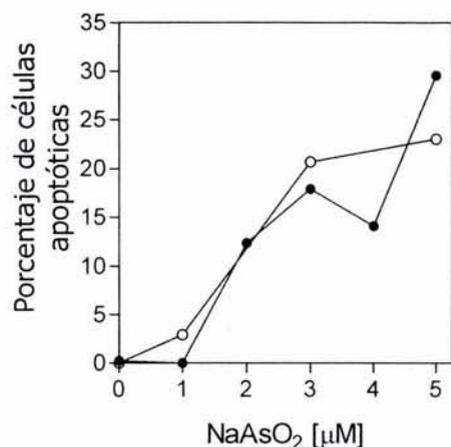
En experimentos anteriores se demostró que los linfocitos CD8<sup>+</sup> son más sensibles al NaAsO<sub>2</sub> que los CD4<sup>+</sup>. Debido a esto, se analizó si la diferencia en la sensibilidad era debida a diferencias en el ciclo celular y/o apoptosis. Al estudiar el ciclo celular (Fig. 31A) se observa que el porcentaje de células en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> se incrementa de manera dosis dependiente, tanto en los linfocitos CD4<sup>+</sup> como en los CD8<sup>+</sup>, y este incremento es similar en ambas poblaciones. Esto indica que el efecto del NaAsO<sub>2</sub> de impedir que los linfocitos entren a ciclo celular es el mismo en linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. El análisis del porcentaje de células en la fase S (Fig. 31B) muestra que hay una reducción dosis dependiente y equivalente entre ambas poblaciones. Esto confirma que los linfocitos CD4<sup>+</sup> y los CD8<sup>+</sup> son igualmente incapaces de progresar en el ciclo celular. Finalmente, al analizar la fase G<sub>2</sub>/M (Fig. 31C) se aprecia que no hay diferencias en el porcentaje

de células al incrementar la concentración de  $\text{NaAsO}_2$  y que el comportamiento es el mismo en ambas poblaciones. Estos datos sugieren que el  $\text{NaAsO}_2$  evita que los linfocitos progresen al ciclo celular, que este efecto es similar en linfocitos  $\text{CD4}^+$  y en  $\text{CD8}^+$ , y se concluye que la sensibilidad desigual de las poblaciones al  $\text{NaAsO}_2$  no se debe a efectos diferentes del compuesto en el ciclo celular.



**FIG. 28 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR DE LINFOCITOS  $\text{CD4}^+$  Y  $\text{CD8}^+$ .** Las células  $\text{CD4}^+$  (●) y  $\text{CD8}^+$  (○) fueron separadas por selección magnética positiva. Se incubaron por 24h con concentraciones crecientes de  $\text{NaAsO}_2$  (1-5 $\mu\text{M}$ ) y activadas con PHA por 72 h. Posteriormente se fijaron en etanol, se extrajo el DNA de bajo peso molecular y se incubaron con RNAsa y PI. Finalmente se capturaron los datos en el citómetro inmediatamente. La cantidad de DNA se definió con los parámetros de FL2-A vs FL2-W y posteriormente se analizaron los datos en función de FL2-H. EL porcentaje de células en cada fase se obtuvo analizando los datos en el programa MODFIT LT

Paralelamente, se analizó el porcentaje de células apoptóticas en estas muestras. En la Fig.32 se muestra que el  $\text{NaAsO}_2$  induce apoptosis de manera dosis dependiente y que esta inducción es similar en linfocitos  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ .



**FIG. 29 ANÁLISIS DEL EFECTO APOPTÓTICO DEL NaAsO<sub>2</sub> EN LINFOCITOS CD4<sup>+</sup> (●) Y CD8<sup>+</sup> (○).** Las células CD4<sup>+</sup> (●) y CD8<sup>+</sup> (○) fueron separadas por selección magnética positiva fueron incubadas por 24h en presencia de diferentes concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> (1-5μM). Los datos se analizaron como se indica en la Fig. 31 y el porcentaje de células apoptóticas se calculó utilizando el programa MODFIT LT. Para la comparación de estos datos se le restó a cada punto el valor correspondiente a las células apoptóticas estimuladas sin NaAsO<sub>2</sub>. Éste valor corresponde a 0.24 para los CD4<sup>+</sup> y a 7.86 para los CD8<sup>+</sup>.

El hecho de que observemos tanto para los linfocitos CD4<sup>+</sup> como para los CD8<sup>+</sup> arresto celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y efecto apoptótico del NaAsO<sub>2</sub>, explica en parte la reducción en la proliferación de ambas poblaciones, sin embargo no explica la diferencia en la disminución en la proliferación de cada una de ellas.

### **2.3 Análisis de la expresión de las moléculas CD69 y CD25**

Debido a que la sensibilidad al efecto del NaAsO<sub>2</sub> en las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> no se explica por alteraciones en el ciclo celular ni por la inducción de apoptosis, nos preguntamos si el NaAsO<sub>2</sub> tiene un efecto diferencial sobre la activación de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Para responder esta pregunta, se analizó la expresión del marcador de activación temprana CD69 y la expresión de la cadena α del receptor de la IL-2 o CD25, el cual se considera un marcador de activación tardía. Para ello, diseñamos un experimento que nos permitiera analizar el efecto del NaAsO<sub>2</sub> (1-5μM) en una cinética de 72 h.

En la Fig. 33 se observa el efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre los marcadores de activación CD69 y CD25 en linfocitos CD4<sup>+</sup> expuestos a concentraciones crecientes de NaAsO<sub>2</sub> (1-5μM) en una cinética de 72 h. Primero, se analizó el patrón de las moléculas de activación de los linfocitos CD4<sup>+</sup>

a las 24h. Se aprecia que en las células estimuladas sin NaAsO<sub>2</sub> (A) la mayor cantidad de células son positivas para ambos marcadores, y se pueden distinguir en menor cantidad un grupo de células que son positivas únicamente para el marcador CD69, las cuales se encuentran en una etapa más temprana de activación. Cuando se exponen los linfocitos a NaAsO<sub>2</sub> (B-F) se observa que de manera dosis dependiente hay una disminución en la cantidad de células CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, así como una acumulación de células CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Esto demuestra que en linfocitos CD4<sup>+</sup> el NaAsO<sub>2</sub> no interfiere con la expresión del marcador CD69, pero inhibe la expresión del marcador CD25.

En la misma figura se observa el patrón de activación a las 48 h. En las células estimuladas sin NaAsO<sub>2</sub> (G) el mayor número de células son dobles positivas, 5% de las células que son sólo CD69<sup>+</sup> y comienza a acumularse una población que es únicamente CD25<sup>+</sup> (activación tardía). Cuando se exponen los linfocitos a NaAsO<sub>2</sub> (H-L) observamos que las células aún son capaces de expresar el marcador CD69 y se comienza a ver una acumulación de células dobles positivas, pero no una población CD25<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>. Estos datos sugieren que al ser expuestos al NaAsO<sub>2</sub> los linfocitos CD4<sup>+</sup> se activan de manera apropiada, ya que expresan el marcador CD69, sin embargo su capacidad de expresar el marcador CD25 es reducida en comparación con el control.

A las 72 h se aprecia que de las células estimuladas sin NaAsO<sub>2</sub> (M) la mayor parte han perdido el marcador CD69, pero siguen expresando CD25, por lo que se encuentran en la fase tardía de la activación. En las células expuestas a NaAsO<sub>2</sub> (N-R) se observa que ahora el mayor porcentaje se encuentra como células dobles positivas, y en las células expuestas a las concentraciones más bajas (N y O) se encuentran también células en la fase tardía de la activación (CD25<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>). Esto sugiere que el NaAsO<sub>2</sub> no inhibe la expresión del marcador CD25, sino que la retrasa. Resulta interesante que los linfocitos expuestos a 5µM de NaAsO<sub>2</sub> y estimulados por 72 h presentan un patrón de expresión muy semejante a los linfocitos sin exponer a NaAsO<sub>2</sub> estimulados por 24 h (A).

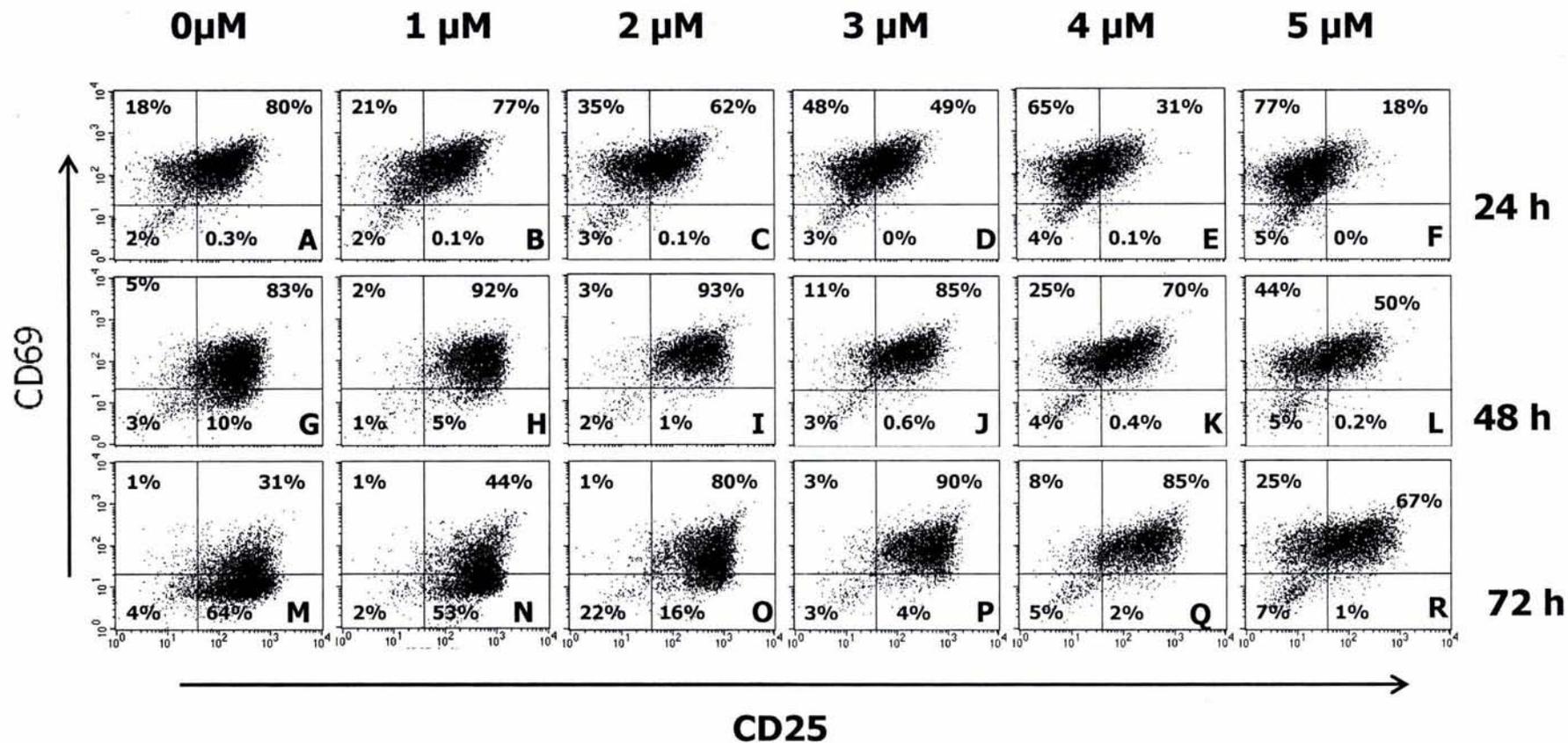
Los datos obtenidos muestran que el NaAsO<sub>2</sub> no afecta la activación temprana de los linfocitos CD4<sup>+</sup>, pero retrasa la expresión del marcador CD25, y la pérdida de la expresión del marcador CD69. Esto sugiere que el NaAsO<sub>2</sub> retrasa la cinética normal de activación de los linfocitos CD4<sup>+</sup>.

De igual manera analizamos la cinética de activación de los linfocitos CD8<sup>+</sup> en presencia de NaAsO<sub>2</sub> (Fig. 34). Se observa en las células CD8<sup>+</sup> activadas por 24 h sin NaAsO<sub>2</sub> (A) que el mayor porcentaje son CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, y sólo un porcentaje pequeño son CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Cuando exponemos las células a NaAsO<sub>2</sub> (B-F) se reduce de manera dosis dependiente la cantidad de linfocitos dobles positivos, y que se acumulan los linfocitos que son únicamente CD69<sup>+</sup>; sin embargo, también se incrementa la cantidad de células dobles negativas. Estos datos muestran que el NaAsO<sub>2</sub> interfiere con la expresión del marcador CD25, y además impide la activación de un porcentaje de la población, el cual corresponde a las células que son incapaces de expresar el marcador CD69.

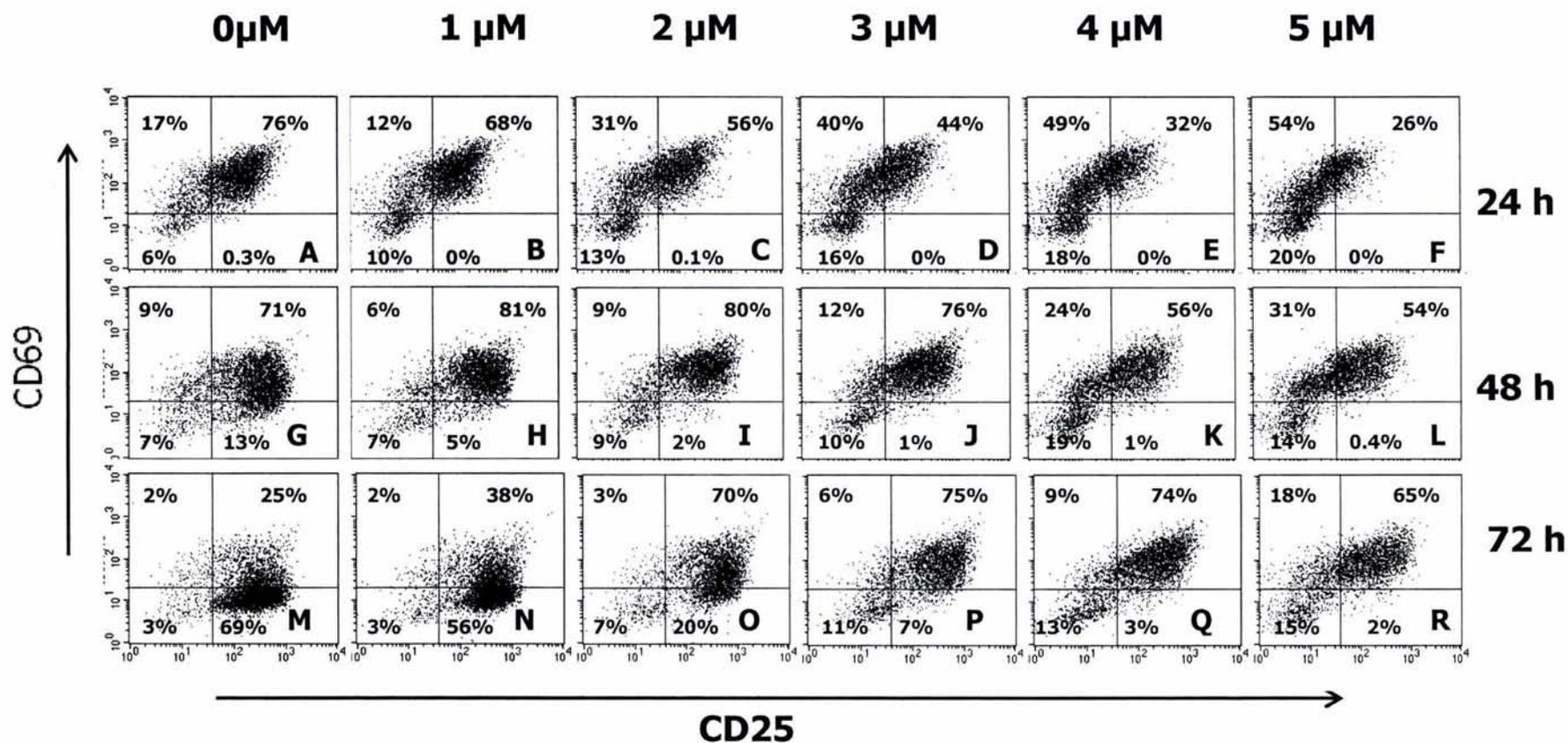
A las 48 h post-activación, en las células estimuladas en ausencia de NaAsO<sub>2</sub> (G), el mayor porcentaje sigue siendo dobles positivas; hay una reducción de las células CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, y un aumento de células CD25<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>. En presencia de NaAsO<sub>2</sub> (H-L) se observa una acumulación de células dobles positivas, así como acumulación de células dobles negativas al incrementar la concentración de NaAsO<sub>2</sub>. Estos datos muestran que los linfocitos que lograron activarse a las 24 h, es decir, las células CD69<sup>+</sup>, son capaces de progresar en la activación, pues recuperan la expresión del marcador CD25, sin embargo seguimos observando un porcentaje de la población que no ha sido capaz de activarse (CD69<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>).

A las 72h, en ausencia de NaAsO<sub>2</sub> (M) el mayor porcentaje de los linfocitos CD8<sup>+</sup> son CD25<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup> y todavía se encuentran algunos dobles positivos. Cuando analizamos las células expuestas a NaAsO<sub>2</sub> (N-R) a las menores concentraciones (N y O) la mayor parte son dobles positivas y algunas con CD25<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>. En el caso de las concentraciones mayores (P-R) se sigue incrementando el porcentaje de células dobles positivas, pero no hay todavía una acumulación de células CD25<sup>+</sup> CD69<sup>-</sup> y todavía se encuentran células CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. También en este punto hay una acumulación de células dobles negativas, esto es, que no se han activado. Estos datos sugieren que el NaAsO<sub>2</sub> retrasa los patrones de activación normal de los linfocitos CD8<sup>+</sup> y que a diferencia de los CD4<sup>+</sup>, hay una población que es incapaz de activarse.

Podemos concluir que el NaAsO<sub>2</sub> atrasa la activación habitual de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estimulados con PHA provocando un retraso en el patrón normal de la pérdida del marcador CD69, así como un retraso en la expresión del marcador CD25. Sin embargo los linfocitos CD8<sup>+</sup> son más sensibles al NaAsO<sub>2</sub>, ya que en el caso de estos existe un porcentaje de esta población que resulta incapaz de activarse, debido al NaAsO<sub>2</sub>.



**FIG. 30 CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES CD69 Y CD25 EN LINFOCITOS CD4<sup>+</sup> EXPUESTOS A NaAsO<sub>2</sub>.** PBMC totales fueron incubados con concentraciones crecientes de NaAsO<sub>2</sub> por 24 h, estimulados con PHA y cosechados a las 24, 48 y 72 h. Se determinó la expresión de CD69 y CD25 en la población CD4<sup>+</sup> utilizando anticuerpos anti-CD69-FITC, anti-CD25-Cy5, y anti-CD4-PE. La región positiva para CD4 fue seleccionada y analizada para la expresión simultánea de CD69 y CD25.



**FIG. 31 CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES CD69 Y CD25 EN LINFOCITOS CD8<sup>+</sup> EXPUESTOS A NaAsO<sub>2</sub>.** PBMC totales fueron incubados con concentraciones crecientes de NaAsO<sub>2</sub> por 24 h, estimulados con PHA y cosechados a las 24, 48 y 72 h. Se determinó la expresión de CD69 y CD25 en la población CD8<sup>+</sup> utilizando anticuerpos anti-CD69-FITC, anti-CD25-Cy5, y anti-CD4-PE. La región positiva para CD8 fue seleccionada y analizada para la expresión simultánea de CD69 y CD25.

## V Discusión

Se ha reportado previamente que el NaAsO<sub>2</sub> reduce la proliferación de linfocitos T humanos estimulados con PHA *in vitro* [56,58,60]. En este trabajo utilizamos el colorante CFSE para analizar el efecto del NaAsO<sub>2</sub> en la proliferación de los linfocitos T humanos, así como sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Se utilizaron concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> de 1μM a 5μM debido a que existe una gran variedad de concentraciones de As en agua de bebida en diferentes regiones, y que esto influye en la concentración de As en sangre[44,111-113]. Cabe señalar que en muchos estudios utilizan concentraciones que se encuentran igual o por debajo de la concentración permitida por organizaciones como la ACSH (American Council on Science and Health), que corresponde a 50μg/l de agua [17], así como concentraciones que rebasan por mucho las reportadas en regiones con agua contaminada por As, por lo que la asociación de los diferentes efectos reportados del NaAsO<sub>2</sub> debe ser analizada cuidadosamente.

El daño que causa el As en linfocitos se ha evaluado de diferentes maneras, una de ellas es el análisis de su proliferación al activarlas con un mitógeno. Tradicionalmente se utilizan los ensayos de incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina para analizar la proliferación celular. Nosotros utilizamos el colorante CFSE para el análisis de la proliferación debido a su fácil manejo y a la información que proporciona. El CFSE es un colorante que ha resultado muy útil en estudios sobre la proliferación de diferentes células del sistema inmune [114] ya que proporciona información detallada de cada célula, así como sobre la historia de las divisiones de un cultivo celular. Estos detalles se refieren al número de veces que se dividen los linfocitos al ser estimulados, la cantidad de células en cada una de las divisiones y el porcentaje de células que fueron capaces de dividirse de la población inicial (*células divididas*)[109]. Esto se debe a que el colorante se incorpora a las células antes de comenzar a dividirse y es posible detectar su fluorescencia en cada división posterior, a diferencia de métodos como la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina o de BrdU que únicamente dan información respecto a una ventana particular en el tiempo de la proliferación, la cual corresponde al tiempo del pulso. También es un método muy versátil, pues puede ser combinado con la técnica de inmunofluorescencia para identificar diferentes características fenotípicas de la población que se está dividiendo. Además de sus

ventajas en cultivos *in vitro*, también ha sido útil en modelos *in vivo* en el estudio de fenómenos como "homing" o proliferación de linfocitos B, T, células NK, timocitos y células de memoria [114-116]

El uso del colorante CFSE en nuestro modelo confirma la reducción en la proliferación antes reportada mediante el análisis de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina [56,117]. Los análisis realizados con el colorante CFSE muestran además dos efectos del NaAsO<sub>2</sub> sobre los linfocitos humanos activados con PHA: 1) El NaAsO<sub>2</sub> reduce el número de veces que se dividen los linfocitos T, así como el número de células en cada una de estas divisiones, lo cual indica que el NaAsO<sub>2</sub> reduce la capacidad proliferativa de los linfocitos; 2) Al exponer a los linfocitos T a NaAsO<sub>2</sub> se reduce el porcentaje de las células de la población original que se dividieron, lo cual demuestra que el NaAsO<sub>2</sub> también impide que cierto porcentaje de la población inicial sea capaz de dividirse; más aún, encontramos que estos efectos son dosis dependientes. Estos experimentos muestran que la información obtenida al analizar la proliferación con CFSE provee datos más detallados sobre el comportamiento de los linfocitos en nuestro modelo y que es una buena herramienta para el análisis detallado de la capacidad proliferativa e historia de las divisiones en un cultivo celular.

La disminución en la proliferación causada por la exposición a NaAsO<sub>2</sub> puede deberse a varios factores. Se ha demostrado en diferentes tipos celulares que la exposición a As tiene como consecuencia la formación de micronúcleos [47], aberraciones cromosómicas [16,54] e intercambio de cromátidas hermanas [55]. Se ha sugerido que todos estos efectos pueden ser consecuencia del daño que genera el As a la estructura del citoesqueleto, particularmente a los filamentos de actina [118,119], ya que el citoesqueleto es un elemento crucial para la segregación cromosomal, así como para la citoquinesis [92].

Otro efecto del As que se relaciona con la reducción en la proliferación es su capacidad de generar daño al DNA. El daño que causa el As al DNA se ha evidenciado por el análisis de electroforesis unicelular [120] y especialmente por el incremento en la expresión de p53 [39,121]. p53 es un gen supresor de tumores que se activa cuando hay daño al DNA. El incremento de p53 en la célula puede tener dos consecuencias, arresto del ciclo celular o apoptosis; el resultado depende del momento del ciclo celular en que se encuentre la célula. El arresto celular se genera cuando la célula se encuentra en la fase G<sub>1</sub>, lo cual permite que se repare el DA antes de entrar a la fase S, mientras que la apoptosis ocurre cuando la célula se encuentra en cualquiera de las fases S, G<sub>2</sub> o M [40,88]. El incremento en la expresión de p53 resulta particularmente importante para nuestro modelo, ya que se ha demostrado que ocurre en linfocitos de sangre periférica de sujetos expuestos a

As por agua de bebida, especialmente si ya han desarrollado cáncer de piel [25]. El incremento de p53 contribuye al retraso en la proliferación que observamos al exponer los PBMC a NaAsO<sub>2</sub> así como el incremento de células apoptóticas, ya que cuando se daña el DNA hay una acumulación de p53 en la célula que la detiene en la fase G<sub>1</sub> o bien enciende el programa de apoptosis en las células que fueron dañadas cuando se encontraban proliferando [92].

Se ha reportado que el As reduce la expresión de factores de transcripción como AP-1 y NFκ-B [34,37]. Estos factores de transcripción son importantes para la activación de los genes de la IL-2, CD69 y CD25, ya que tienen en su región promotora sitios para uno o ambos factores de transcripción [122-125]. Sin embargo, se ha demostrado que por lo menos en el caso de la IL-2, a bajas concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> (0.001-1μM), no se altera la cantidad del transcrito [56].

Se ha reportado que al exponer linfocitos humanos a NaAsO<sub>2</sub> hay una acumulación de linfocitos en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular[60]. A diferencia de ese reporte, nosotros utilizamos una técnica para determinar ciclo celular y apoptosis simultáneamente, con la que se encontró un incremento en la población apoptótica pero no en las células que se encuentran en la fase G<sub>1</sub>. Esto sugiere la posibilidad de que el incremento en la cantidad de células en G<sub>1</sub> pueden ser falsos positivos, que serían en realidad células que se encuentran en una fase apoptótica temprana y que aún tienen un tamaño e integridad de la membrana equivalente a una célula en G<sub>1</sub>, por lo que no son distinguibles hasta que se utilizan metodologías más específicas como la extracción del DNA de bajo peso molecular.

Al exponer las células a NaAsO<sub>2</sub> se observa que se reduce el porcentaje de células en las fases S y G<sub>2</sub>/M, lo cual confirma que las células son incapaces de progresar y/o completar el ciclo celular. Esto confirma que el NaAsO<sub>2</sub> reduce la capacidad de los linfocitos activados de iniciar y/o completar el ciclo celular, y sugiere que al menos un porcentaje de las células que no se dividen están entrando a un proceso apoptótico.

El mecanismo por el cual el As induce apoptosis no está completamente, sin embargo se han descrito diversas moléculas relacionadas con la inducción de apoptosis y la sobrevivencia celular en diferentes modelos de exposición a As. En líneas celulares se ha reportado que tanto el NaAsO<sub>2</sub> como el As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> inducen apoptosis debido a una reducción en la actividad de NF-κB. El factor de transcripción NF-κB regula la expresión de moléculas que rescatan a las células de apoptosis como IAPs y TRAFs, que bloquean la actividad de caspasas y también a moléculas como Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, que previenen la

liberación del citocromo C de la mitocondria. [41]. Se ha reportado también que el As induce apoptosis vía el poro de transición de la permeabilidad (PTP) de la mitocondria a través de una reducción en el potencial de la membrana mitocondrial [126]. Resulta en especial interesante que en células Jurkat la exposición a  $\text{NaAsO}_2$  activa tanto a caspasas como a la proteína AKT, que son señales de muerte y sobrevivencia respectivamente. La inhibición de la activación de AKT lleva a la activación de caspasas y por lo tanto a la muerte celular [127]. Estos reportes sugieren que la principal vía por la cual el As ejerce sus propiedades apoptóticas es a través de la vía mitocondrial, lo cual coincide con la apoptosis inducida por la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales son producto de la exposición a As [14].

Los linfocitos expuestos a  $\text{NaAsO}_2$  tienen una expresión menor de los marcadores CD4 y CD8, sin embargo, la subpoblación  $\text{CD8}^+$  es más sensible a la pérdida del marcador que la  $\text{CD4}^+$ . La reducción en la expresión de los marcadores CD4 y CD8 podría deberse a que el  $\text{NaAsO}_2$  daña el citoesqueleto celular [119], lo cual podría limitar el transporte de dichas moléculas a la membrana celular. Las moléculas CD4 y CD8 están involucradas en amplificar la señal de activación fisiológica de linfocitos T, pues interactúan con la molécula de MHC en la célula presentadora de antígeno [72]. Cuando las células son activadas con mitógenos se considera que la activación es resultado de la suma de las interacciones de diferentes receptores involucrados en la activación fisiológica de los linfocitos T [128]. Debido a la importancia de las moléculas CD4 y CD8 en la activación de los linfocitos T, la reducción en la expresión de ambas moléculas podría explicar en parte la reducción en la proliferación observada al exponer los linfocitos a  $\text{NaAsO}_2$ . Sin embargo no existen reportes detallados del papel que tienen las moléculas CD4 y CD8 cuando los linfocitos son estimulados con PHA.

Cuando analizamos el efecto del  $\text{NaAsO}_2$  en la blastogénesis de linfocitos  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  encontramos que el  $\text{NaAsO}_2$  inhibe la transformación blástica de ambas poblaciones. Además observamos una reducción en la cantidad de células  $\text{CD4}^+$ , efecto que no observamos en los linfocitos  $\text{CD8}^+$ . En el caso de los linfocitos  $\text{CD8}^+$ , la reducción en la transformación blástica concuerda con la reducción en la expresión del marcador. En el caso de los linfocitos  $\text{CD4}^+$  no existe esta concordancia y resulta además muy evidente la acumulación de una población de pequeño tamaño y negativa para el marcador. Previamente se reportó que a concentraciones  $\leq 1\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  se reduce la proporción de células  $\text{CD4}^+$  pero no de  $\text{CD8}^+$ , sin embargo, en ese trabajo la reducción en la población  $\text{CD4}^+$  corresponde únicamente a linfocitos de mujeres [129]. Nuestros datos no concuerdan totalmente con

los datos reportados, ya que la reducción en la proporción de linfocitos CD4<sup>+</sup> la observamos tanto en células de hombres como de mujeres. Estas diferencias pueden deberse a que en el presente trabajo las células se expusieron a concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> > 1μM, mientras que en el reporte mencionado utilizan concentraciones < 1μM. Esta diferencia confirma la importancia antes reportada de la concentración en los efectos inmunotóxicos del NaAsO<sub>2</sub> [130].

El efecto diferencial que observamos en la expresión de los marcadores CD4 y CD8 al exponer las células a NaAsO<sub>2</sub> sugirió la posibilidad de encontrar diferencias en otros parámetros. Por otro lado, ya se había reportado que la exposición a NaAsO<sub>2</sub> a concentraciones >1μM induce apoptosis, particularmente en la población CD4<sup>+</sup> [61], por lo que se incrementó la concentración de NaAsO<sub>2</sub> evaluada.

Para determinar los efectos de estas poblaciones de manera independiente se separaron las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por el método de selección magnética positiva. Esta separación implica el uso de anticuerpos acoplados a perlas magnéticas, los cuales las células conservan a lo largo de todo el experimento. Se ha reportado previamente que la presencia de anticuerpos acoplados a perlas magnéticas no afecta la función de los linfocitos ni su producción de citocinas [131]. Además, al analizar la proliferación con CFSE se observan patrones de división equivalentes a los patrones de linfocitos totales activados en cultivos de PBMC totales, lo cual indica que las perlas magnéticas no afectan la proliferación celular.

El análisis de la proliferación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> mostró que hay una reducción en el número de divisiones en ambas poblaciones, sin embargo, la cantidad de células en cada división es siempre menor en el caso de los CD8<sup>+</sup>, así como el porcentaje de las células de la población original que se dividieron. Con lo esto se concluye que los linfocitos CD8<sup>+</sup> son más sensibles que los CD4<sup>+</sup> al efecto del NaAsO<sub>2</sub> la proliferación.

La reducción en la proliferación de linfocitos expuestos a NaAsO<sub>2</sub> se debe en parte a una reducción en la disponibilidad de IL-2 en el medio [56,60], lo cual explica la reducción en la proliferación de ambas poblaciones. Por otro lado, recientemente se ha descrito que los linfocitos CD8<sup>+</sup> no requieren IL-2 durante la proliferación inmediata a la activación, pero es necesaria para mantener la expansión posterior de esta subpoblación [132]. Esto podría explicar por qué hay un número menor de linfocitos CD8<sup>+</sup> en cada una de las divisiones. Probablemente, comienzan a

proliferar, pero la falta de IL-2 causada por la exposición a As no les permite mantener la expansión, razón por la cual encontramos un número menor de linfocitos CD8<sup>+</sup> en comparación con los CD4<sup>+</sup>.

Al analizar el ciclo celular y el porcentaje de células apoptóticas encontramos que el efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre ambas poblaciones es similar. El hecho de que tanto los linfocitos CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup> sean igualmente susceptibles a morir por apoptosis al ser expuestos a NaAsO<sub>2</sub> concuerda con lo antes reportado por Gupta et al [133]. El modelo utilizado por este grupo es con linfocitos humanos no activados expuestos a As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Lo que ellos observan es que el As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induce apoptosis en ambos subtipos celulares por la vía mitocondrial, y en ambas poblaciones hay activación de las caspasas 8, 9 y 3. Reportan también que en ambas poblaciones se generan especies reactivas de oxígeno y que se reduce la cantidad de glutatión intracelular. El glutatión es un antioxidante cuya reducción está asociada con una alta susceptibilidad a iniciar un proceso apoptótico. Finalmente observan que con la exposición a As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se reduce el número de moléculas que inhiben la apoptosis como Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> y VDAC e incrementa la expresión de Bax, que participa en la liberación del citocromo c y promueve la apoptosis [133]. Estos datos sugieren que la apoptosis de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expuestos a As está mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno, y dado que este efecto parece ser el mismo en ambas poblaciones era de esperarse que en ambos casos se iniciara un proceso apoptótico por las mismas vías y explica por qué no vemos diferencias entre las subpoblaciones.

Debido a la similitud de los resultados en el ciclo celular y la apoptosis de ambas subpoblaciones se analizaron eventos más tempranos en la activación de los linfocitos T, como es la expresión de los marcadores CD69 y CD25 en células expuestas a NaAsO<sub>2</sub>.

La molécula CD69 es un marcador de activación muy temprano por lo que su expresión se asocia con una activación apropiada del linfocito T. Normalmente la molécula CD69 tiene su pico de expresión entre las 24 y 48 h después de la estimulación y se pierde su expresión durante las 24 h posteriores al retiro del estímulo [78]. Al analizar la expresión de CD69 en linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se encontró que en ambos casos se retrasa la pérdida del marcador CD69. El hecho de que la expresión del CD69 no se encuentre alterada sugiere que los efectos del NaAsO<sub>2</sub> no son sobre las primeras señales de activación. Sin embargo, el retraso en la pérdida de este marcador nos indica que el arsénico está impidiendo el paso a la siguiente etapa, en la cual ya no es necesaria la expresión del marcador CD69.

El CD25 es otra molécula importante durante la activación del linfocito T, ya que corresponde a la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2 y es el encargado de incrementar la afinidad del receptor con su ligando y por lo tanto de desencadenar la señalización de la IL-2 [84]. Cuando se analizó la expresión del CD25 en linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expuestos a NaAsO<sub>2</sub> se encontró un retraso en la expresión del marcador en ambas poblaciones. La progresión de los linfocitos T de la fase G<sub>1</sub> al resto del ciclo depende de la interacción de la IL-2 con su receptor, por lo que la falta de expresión de este último explica en parte el retraso de la proliferación. Ya se había reportado previamente que el GaAs reduce la expresión del CD25 en linfocitos murinos [134]. Este mismo grupo sugiere que esta reducción se debe a que el As impide la unión del CD25 con las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  que conforman el receptor de la IL-2, ya que el As tiene la propiedad de unirse a grupos sulfidrilo, y tanto el CD25 como la cadena  $\gamma$  tienen diversas uniones disulfuro que podrían ser susceptibles al efecto del As [134].

Se ha reportado que el NaAsO<sub>2</sub> inhibe factores de transcripción que están involucrados con la activación de la IL-2 y del CD25 (AP-1 y NF- $\kappa$ B), lo que podría explicar la reducción en la expresión que observamos, sin embargo esos mismos factores de transcripción están también involucrados en la activación de la molécula CD69, la cual no se ve afectada en su expresión. Otra posibilidad es que el NaAsO<sub>2</sub> esté hipermetilando [49] regiones promotoras de la transcripción de los genes de la IL-2 y del CD25 y por lo tanto las reprima.

Si bien el efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre los marcadores CD69 y CD25 es el mismo tanto en la población CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, encontramos que en la población CD8<sup>+</sup> hay una acumulación de células CD69<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>, la cual parece ser incapaz de activarse. Estos datos muestran una vez más que los linfocitos CD8<sup>+</sup> son más sensibles al NaAsO<sub>2</sub> que los CD4<sup>+</sup>. El hecho de que el As afecte la activación de los linfocitos CD8<sup>+</sup> en un punto tan temprano de la activación podría deberse a simples diferencias estructurales entre las moléculas CD4 y CD8, ya que mientras la molécula CD4 es un monómero, la molécula CD8 es un dímero unido por un puente disulfuro [64], el cual podría ser alterado por el arsénico, limitando la capacidad de los linfocitos CD8<sup>+</sup> de activarse.

El hecho de que no se haya observado una acumulación de células CD69<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> en la población CD4<sup>+</sup> podría deberse a que en estos experimentos sólo analizamos las células positivas para este marcador y como mencionamos anteriormente, existe la posibilidad de que los linfocitos CD4<sup>+</sup> que no se dividen hayan perdido por completo la expresión del marcador, por lo que las células correspondientes a la población CD69<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> no fueron analizadas en este experimento. Con estos

datos surge la idea de que el efecto diferencial del  $\text{NaAsO}_2$  sobre las poblaciones  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  sea sobre características diferentes en cada población (proliferación y expresión de marcadores y moléculas de activación)

Los experimentos fueron realizados con linfocitos de diferentes donadores, y se confirmó que existe una gran variación entre ellos al efecto del  $\text{NaAsO}_2$ , lo cual se había reportado previamente [15,55,135]. Esta variación puede deberse a una predisposición genética. Se ha reportado que existe una sensibilidad semejante en personas de la misma familia, particularmente entre hermanos, y que esta correlación no existe entre familias diferentes [136]. Se ha demostrado que la metilación del As entre familiares es semejante, a diferencia de personas que no están relacionadas entre sí, lo cual sugiere que la capacidad para metilar el As tiene un importante componente familiar[136]. La existencia de esta relación entre familiares podría deberse a polimorfismos heredados en cada familia que podrían afectar genes involucrados en la eficiencia del metabolismo del As o bien sobre moléculas con funciones importantes como la reparación del DNA o la eliminación de radicales libres.

En conclusión, en este trabajo se comprueba que existen diferencias en el efecto del  $\text{NaAsO}_2$  sobre las poblaciones  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ . Se demuestra que a nivel de proliferación y activación los linfocitos  $\text{CD8}^+$  son más sensibles que los linfocitos  $\text{CD4}^+$ , sin embargo, hay una reducción en el porcentaje de linfocitos  $\text{CD4}^+$ , pero no de linfocitos  $\text{CD8}^+$ . El hecho de que al As afecte de manera diferente a los linfocitos  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  explicaría en parte la susceptibilidad de las personas expuestas a agua de bebida con As a desarrollar procesos cancerosos. Si bien es cierto que ambas subpoblaciones están involucradas en la eliminación de células tumorales [137], es a los linfocitos  $\text{CD8}^+$  a quienes se les atribuye el papel más importante, debido a su función citotóxica. El efecto diferencial del  $\text{NaAsO}_2$  sobre los linfocitos T  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  sugiere un doble efecto del As, ya que por un lado es un compuesto cancerígeno en diferentes tejidos, y por otro lado, al afectar principalmente a los linfocitos  $\text{CD8}^+$  limitaría la capacidad del sistema inmune de enfrentarse a un proceso canceroso.

## VI Bibliografía

1. Burns, R. A., en Fundamentos de Química. Cap.7. Propiedades periódicas de los elementos. Prentice Hall, México, 2004
2. .Budavari, S. The Merck Index (Whitehouse Station, New Jersey, ed. 13, 2001), pp. 134-136.
3. .Hawley, G. G. Diccionario de Química y Productos Químicos Barcelona, 1993), pp. 96-98.
4. Shen Z.X., Chen G.Q., Ni J.H., Li X.S., Xiong S.M., Qiu Q.Y. et al. (1997). Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. Blood. 89 (9). 3354-3360
5. Waxman S. y Anderson K.C. (2001). History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. Oncologist. 6 Suppl 2. 3-10
6. Soignet S.L., Maslak P., Wang Z.G., Jhanwar S., Calleja E., Dardashti L.J. et al. (1998). Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. N.Engl.J.Med. 339 (19). 1341-1348
7. Ng J.C., Wang J., y Shraim A. (2003). A global health problem caused by arsenic from natural sources. Chemosphere. 52 (9). 1353-1359
8. Yamamura, S. (2001) Drinking water guidelines and standards. [www.who.int/entity/water\\_sanitation\\_health/dwg/en/arsenicun5.pdf](http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/dwg/en/arsenicun5.pdf)
9. Abernathy C.O., Thomas D.J., y Calderon R.L. (2003). Health effects and risk assessment of arsenic. J.Nutr. 133 (5 Suppl 1). 1536S-1538S
10. Cavigelli M., Li W.W., Lin A., Su B., Yoshioka K., y Karin M. (1996). The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. EMBO J. 15 (22). 6269-6279
11. Klemperer N.S. y Pickart C.M. (1989). Arsenite inhibits two steps in the ubiquitin-dependent proteolytic pathway. J.Biol.Chem. 264 (32). 19245-19252
12. Bertolero F., Pozzi G., Sabbioni E., y Saffiotti U. (1987). Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. Carcinogenesis. 8 (6). 803-808
13. Thomas D.J., Styblo M., y Lin S. (2001). The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. Toxicol.Appl.Pharmacol. 176 (2). 127-144
14. Huang C., Ke Q., Costa M., y Shi X. (2004). Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. Mol.Cell Biochem. 255 (1-2). 57-66
15. Sordo M., Herrera L.A., Ostrosky-Wegman P., y Rojas E. (2001). Cytotoxic and genotoxic effects of As, MMA, and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. Teratog.Carcinog.Mutagen. 21 (4). 249-260

16. Rossman T.G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat.Res.* 533 (1-2). 37-65
17. Brown K.G. y Ross G.L. (2002). Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 36 (2). 162-174
18. Lee M.Y., Jung B.I., Chung S.M., Bae O.N., Lee J.Y., Park J.D. et al. (2003). Arsenic-induced dysfunction in relaxation of blood vessels. *Environ.Health Perspect.* 111 (4). 513-517
19. Tchounwou P.B., Centeno J.A., y Patlolla A.K. (2004). Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis--a health risk assessment and management approach. *Mol.Cell Biochem.* 255 (1-2). 47-55
20. Mazumder, D.N. (2000) Diagnosis and treatment of chronic arsenic poisoning. [www.who.int/entity/water\\_sanitation\\_health/dwq/en/arsenicun4.pdf](http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/dwq/en/arsenicun4.pdf)
21. Lynn S., Gurr J.R., Lai H.T., y Jan K.Y. (2000). NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 86 (5). 514-519
22. Tseng C.H., Tai T.Y., Chong C.K., Tseng C.P., Lai M.S., Lin B.J. et al. (2000). Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Environ.Health Perspect.* 108 (9). 847-851
23. Mukherjee S.C., Rahman M.M., Chowdhury U.K., Sengupta M.K., Lodh D., Chanda C.R. et al. (2003). Neuropathy in arsenic toxicity from groundwater arsenic contamination in West Bengal, India. *J.Environ.Sci.Health Part A Tox.Hazard.Subst.Environ.Eng.* 38 (1). 165-183
24. Chen C.J., Wu M.M., Lee S.S., Wang J.D., Cheng S.H., y Wu H.Y. (1988). Atherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water. Multiple risk factors and related malignant neoplasms of blackfoot disease. *Arteriosclerosis.* 8 (5). 452-460
25. Salazar A.M., Calderon-Aranda E., Cebrian M.E., Sordo M., Bendesky A., Gomez-Munoz A. et al. (2004). p53 expression in circulating lymphocytes of non-melanoma skin cancer patients from an arsenic contaminated region in Mexico. A pilot study. *Mol.Cell Biochem.* 255 (1-2). 25-31
26. Lee A.M. y Fraumeni J.F., Jr. (1969). Arsenic and respiratory cancer in man: an occupational study. *J.Natl.Cancer Inst.* 42 (6). 1045-1052
27. Barrett J.C., Lamb P.W., Wang T.C., y Lee T.C. (1989). Mechanisms of arsenic-induced cell transformation. *Biol.Trace Elem.Res.* 21. 421-429
28. Danaee H., Nelson H.H., Liber H., Little J.B., y Kelsey K.T. (2004). Low dose exposure to sodium arsenite synergistically interacts with UV radiation to induce mutations and alter DNA repair in human cells. *Mutagenesis.* 19 (2). 143-148
29. Chang W.K., Yang K.D., Chuang H., Jan J.T., y Shaio M.F. (2002). Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. *Clin.Immunol.* 104 (2). 151-160

30. Kitchin K.T. y Ahmad S. (2003). Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol.Lett.* 137 (1-2). 3-13
31. Barchowsky A., Klei L.R., Dudek E.J., Swartz H.M., y James P.E. (1999). Stimulation of reactive oxygen, but not reactive nitrogen species, in vascular endothelial cells exposed to low levels of arsenite. *Free Radic.Biol.Med.* 27 (11-12). 1405-1412
32. Nordenson I. y Beckman L. (1991). Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Hum.Hered.* 41 (1). 71-73
33. Wang T.S. y Huang H. (1994). Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. *Mutagenesis.* 9 (3). 253-257
34. Hu Y., Jin X., y Snow E.T. (2002). Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappaB DNA binding activity and related gene expression. *Toxicol.Lett.* 133 (1). 33-45
35. Shi H., Shi X., y Liu K.J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol.Cell Biochem.* 255 (1-2). 67-78
36. Simeonova P.P., Wang S., Toriuma W., Kommineni V., Matheson J., Unimye N. et al. (2000). Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Res.* 60 (13). 3445-3453
37. Wijeweera J.B., Gandolfi A.J., Parrish A., y Lantz R.C. (2001). Sodium arsenite enhances AP-1 and NFkappaB DNA binding and induces stress protein expression in precision-cut rat lung slices. *Toxicol.Sci.* 61 (2). 283-294
38. Pi J., Qu W., Reece J.M., Kumagai Y., y Waalkes M.P. (2003). Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Exp.Cell Res.* 290 (2). 234-245
39. Filippova M. y Duerksen-Hughes P.J. (2003). Inorganic and dimethylated arsenic species induce cellular p53. *Chem.Res.Toxicol.* 16 (3). 423-431
40. Lewin, B., en *Genes. Cap.28. Oncogenes and Cancer.* Oxford, New York, 2000
41. Mathas S., Lietz A., Janz M., Hinz M., Jundt F., Scheidereit C. et al. (2003). Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood.* 102 (3). 1028-1034
42. Zheng X.H., Watts G.S., Vaught S., y Gandolfi A.J. (2003). Low-level arsenite induced gene expression in HEK293 cells. *Toxicology.* 187 (1). 39-48
43. Lu T., Liu J., LeCluyse E.L., Zhou Y.S., Cheng M.L., y Waalkes M.P. (2001). Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol.Sci.* 59 (1). 185-192
44. Wu M.M., Chiou H.Y., Ho I.C., Chen C.J., y Lee T.C. (2003). Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects. *Environ.Health Perspect.* 111 (11). 1429-1438

45. Rossman T.G., Stone D., Molina M., y Troll W. (1980). Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ.Mutagen.* 2 (3). 371-379
46. Lee T.C., Tanaka N., Lamb P.W., Gilmer T.M., y Barrett J.C. (1988). Induction of gene amplification by arsenic. *Science.* 241 (4861). 79-81
47. Gonsebatt M.E., Vega L., Salazar A.M., Montero R., Guzman P., Blas J. et al. (1997). Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat.Res.* 386 (3). 219-228
48. Jha A.N., Noditi M., Nilsson R., y Natarajan A.T. (1992). Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat.Res.* 284 (2). 215-221
49. Zhong C.X. y Mass M.J. (2001). Both hypomethylation and hypermethylation of DNA associated with arsenite exposure in cultures of human cells identified by methylation-sensitive arbitrarily-primed PCR. *Toxicol.Lett.* 122 (3). 223-234
50. Mass M.J. y 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. *Mutat.Res.* 386 (3). 263-277
51. Irvine R.A., Lin I.G., y Hsieh C.L. (2002). DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. *Mol.Cell Biol.* 22 (19). 6689-6696
52. Bustamante J., Dock L., Vahter M., Fowler B., y Orrenius S. (1997). The semiconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes. *Toxicology.* 118 (2-3). 129-136
53. Sengupta M. y Bishayi B. (2002). Effect of lead and arsenic on murine macrophage response. *Drug Chem.Toxicol.* 25 (4). 459-472
54. Nordenson I., Sweins A., y Beckman L. (1981). Chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to trivalent and pentavalent arsenic. *Scand.J.Work Environ.Health.* 7 (4). 277-281
55. Rasmussen R.E. y Menzel D.B. (1997). Variation in arsenic-induced sister chromatid exchange in human lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat.Res.* 386 (3). 299-306
56. Vega L., Ostrosky-Wegman P., Fortoul T.I., Diaz C., Madrid V., y Saavedra R. (1999). Sodium arsenite reduces proliferation of human activated T-cells by inhibition of the secretion of interleukin-2. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 21 (2). 203-220
57. Meng Z. (1993). Effects of arsenic on DNA synthesis in human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. *Biol.Trace Elem.Res.* 39 (1). 73-80
58. Ostrosky-Wegman P., Gonsebatt M.E., Montero R., Vega L., Barba H., Espinosa J. et al. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat.Res.* 250 (1-2). 477-482
59. Gonsebatt M.E., Vega L., Herrera L.A., Montero R., Rojas E., Cebrian M.E. et al. (1992). Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat.Res.* 283 (2). 91-95

60. Galicia G., Leyva R., Tenorio E.P., Ostrosky-Wegman P., y Saavedra R. (2003). Sodium arsenite retards proliferation of PHA-activated T cells by delaying the production and secretion of IL-2. *Int.Immunopharmacol.* 3 (5). 671-682
61. Yu H.S., Liao W.T., Chang K.L., Yu C.L., y Chen G.S. (2002). Arsenic induces tumor necrosis factor alpha release and tumor necrosis factor receptor 1 signaling in T helper cell apoptosis. *J.Invest Dermatol.* 119 (4). 812-819
62. Parham, P. *The Immune System* (Garland, ed. first, 2000).
63. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., y Slomchik, M. *Immunobiology 5. The immune system in Health and Disease* (Garland Publishing, New York, NY, ed. 5, 2001).
64. Leahy D.J. (1995). A structural view of CD4 and CD8. *FASEB J.* 9 (1). 17-25
65. Alberts, B. et al., en *Molecular Biology of the Cell*. Cap.24. The Adaptive Immune System. Garland Science, New York, 2002
66. Hennecke J. y Wiley D.C. (2001). T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell.* 104 (1). 1-4
67. Margulies, D. H. y McCluskey, J., en *Fundamental Immunology*. Cap.19. The Major Histocompatibility Complex and Its Encoded Proteins. William E.Paul, Ed. Lippincott Williams & Williams, 2003
68. Yusuf I. y Fruman D.A. (2003). Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol.* 24 (7). 380-386
69. Gao G.F. y Jakobsen B.K. (2000). Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol.Today.* 21 (12). 630-636
70. Weiss, A. y Samelson, L. E., en *Fundamental Immunology*. Cap.11. T-Lymphocyte Activation. William E.Paul, Ed. Lippincott Williams & Williams, 2003
71. Arthur Weiss y Lawrence E.Samelson, en *Fundamental Immunology*. Cap.11. T-Lymphocyte Activation. William E.Paul, Ed. Lippincott Williams & Williams, 2003
72. Charles A.Janeway, Paul Travers, Mark Walport, y Mark Shlomchik *Immunobiology 5. The immune system in Health and Disease* (Garland Publishing, New York, NY, ed. 5, 2001).
73. Gao G.F., Rao Z., y Bell J.I. (2002). Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol.* 23 (8). 408-413
74. Germain R.N. (2003). T-cell activation: the power of one. *Curr.Biol.* 13 (4). R137-R139
75. Thome M., Duplay P., Guttinger M., y Acuto O. (1995). Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56lck/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/zeta complex. *J.Exp.Med.* 181 (6). 1997-2006
76. Huang Y. y Wange R.L. (2004). T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *J.Biol.Chem.* 279 (28). 28827-28830

77. Natarajan K., Sawicki M.W., Margulies D.H., y Mariuzza R.A. (2000). Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry*. 39 (48). 14779-14786
78. Lopez-Cabrera M., Santis A.G., Fernandez-Ruiz E., Blacher R., Esch F., Sanchez-Mateos P. et al. (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. *J.Exp.Med.* 178 (2). 537-547
79. Testi R., D'Ambrosio D., De Maria R., y Santoni A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol.Today*. 15 (10). 479-483
80. Smith K.A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 240 (4856). 1169-1176
81. Sarah L.Gaffen, Mark A.Goldsmith, y Warner C.Green, en *The Cytokine Handbook*. Cap.4. Interleukin-2 and the Interleukin-2 receptor. Angus Thomson, Ed. Academic Press, London, 1998
82. Stern J.B. y Smith K.A. (1986). Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression. *Science*. 233 (4760). 203-206
83. Dooms H., Kahn E., Knoechel B., y Abbas A.K. (2004). IL-2 induces a competitive survival advantage in T lymphocytes. *J.Immunol.* 172 (10). 5973-5979
84. Gesbert F., Delespine-Carmagnat M., y Bertoglio J. (1998). Recent advances in the understanding of interleukin-2 signal transduction. *J.Clin.Immunol.* 18 (5). 307-320
85. Greene W.C. y Leonard W.J. (1986). The human interleukin-2 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 4. 69-95
86. Waldmann T.A. (1989). The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu.Rev.Biochem.* 58. 875-911
87. Beadling C. y Smith K.A. (2002). DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Med.Immunol.* 1 (1). 2
88. Alberts, B. et al., en *Molecular Biology of the Cell*. Cap.17. The cell cycle and programmed cell death. Garland Science, New York, 2002
89. Fan W., Richter G., Cereseto A., Beadling C., y Smith K.A. (1999). Cytokine response gene 6 induces p21 and regulates both cell growth and arrest. *Oncogene*. 18 (47). 6573-6582
90. Beadling C., Cereseto A., Fan W., Naramura M., y Smith K.A. (2001). Cytokine response gene 8 (CR8) regulates the cell cycle G1-S phase transition and promotes cellular survival. *Oncogene*. 20 (14). 1771-1783
91. Kondrack R.M., Harbertson J., Tan J.T., McBreen M.E., Surh C.D., y Bradley L.M. (2003). Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J.Exp.Med.* 198 (12). 1797-1806

92. Bruce Alberts et al., en *Molecular Biology of the Cell*. Cap.17. The cell cycle and programmed cell death. Garland Science, New York, 2002
93. Moller M.B. (2000). P27 in cell cycle control and cancer. *Leuk.Lymphoma*. 39 (1-2). 19-27
94. Wurster A.L., Tanaka T., y Grusby M.J. (2000). The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene*. 19 (21). 2577-2584
95. Gary S Stein, André J van Wijnen, Janet L Stein, Jane B Lian, y Thomas A Owen, en *Encyclopedia of Life Sciences*. Cap. Cell Cycle. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2002
96. Hitoshi Y., Lorens J., Kitada S.I., Fisher J., LaBarge M., Ring H.Z. et al. (1998). Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*. 8 (4). 461-471
97. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., y Coffman R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol*. 136 (7). 2348-2357
98. Fitch F.W., McKisic M.D., Lancki D.W., y Gajewski T.F. (1993). Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu.Rev.Immunol*. 11. 29-48
99. Kourilsky P. y Truffa-Bachi P. (2001). Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol*. 22 (9). 502-509
100. O'Garra A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 8 (3). 275-283
101. London C.A., Abbas A.K., y Kelso A. (1998). Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development. *Vet.Immunol.Immunopathol*. 63 (1-2). 37-44
102. Weiner H.L. (2001). Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes.Infect*. 3 (11). 947-954
103. Baecher-Allan C., Viglietta V., y Hafler D.A. (2004). Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin.Immunol*. 16 (2). 89-98
104. Vukmanovic-Stejic M., Vyas B., Gorak-Stolinska P., Noble A., y Kemeny D.M. (2000). Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*. 95 (1). 231-240
105. Mosmann T.R., Li L., y Sad S. (1997). Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin.Immunol*. 9 (2). 87-92
106. Shresta S., Pham C.T., Thomas D.A., Graubert T.A., y Ley T.J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr.Opin.Immunol*. 10 (5). 581-587
107. Lyons A.B. y Parish C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J.Immunol.Methods*. 171 (1). 131-137

108. Molecular Probes. (2004) Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester (CFDA, SE) product information. [www.probes.com](http://www.probes.com)
109. Lyons A.B. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J.Immunol.Methods*. 243 (1-2). 147-154
110. Robinson, J.P. (2001) Current Protocols in Cytometry. <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/browsebyproduct?type=5>
111. Concha G., Vogler G., Nermell B., y Vahter M. (1998). Low-level arsenic excretion in breast milk of native Andean women exposed to high levels of arsenic in the drinking water. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*. 71 (1). 42-46
112. D.N.Guha Mazumder, M.D. (2000) Diagnosis and treatment of chronic arsenic poisoning. [www.who.int/entity/water\\_sanitation\\_health/dwq/en/arsenicun4.pdf](http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/dwq/en/arsenicun4.pdf)
113. Wu M.M., Chiou H.Y., Wang T.W., Hsueh Y.M., Wang I.H., Chen C.J. et al. (2001). Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. *Environ.Health Perspect*. 109 (10). 1011-1017
114. Lyons A.B. (1999). Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol.Cell Biol*. 77 (6). 509-515
115. Graziano M., St Pierre Y., Beauchemin C., Desrosiers M., y Potworowski E.F. (1998). The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE. *Exp.Cell Res*. 240 (1). 75-85
116. Lee W.T. y Pelletier W.J. (1998). Visualizing memory phenotype development after in vitro stimulation of CD4(+) T cells. *Cell Immunol*. 188 (1). 1-11
117. Goytia-Acevedo R.C., Cebrian M.E., y Calderon-Aranda E.S. (2003). Differential effects of arsenic on intracellular free calcium levels and the proliferative response of murine mitogen-stimulated lymphocytes. *Toxicology*. 189 (3). 235-244
118. Menzel D.B., Hamadeh H.K., Lee E., Meacher D.M., Said V., Rasmussen R.E. et al. (1999). Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells. *Toxicol.Lett*. 105 (2). 89-101
119. Li W. y Chou I.N. (1992). Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultured cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol*. 114 (1). 132-139
120. Mouron S.A., Golijow C.D., y Dulout F.N. (2001). DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat.Res*. 498 (1-2). 47-55
121. Salazar A.M., Ostrosky-Wegman P., Menendez D., Miranda E., Garcia-Carranca A., y Rojas E. (1997). Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat.Res*. 381 (2). 259-265
122. Serfling E., Avots A., y Neumann M. (1995). The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim.Biophys.Acta*. 1263 (3). 181-200
123. Castellanos M.C., Munoz C., Montoya M.C., Lara-Pezzi E., Lopez-Cabrera M., y de Landazuri M.O. (1997). Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. *J.Immunol*. 159 (11). 5463-5473

124. Castellanos M.C., Lopez-Giral S., Lopez-Cabrera M., y de Landazuri M.O. (2002). Multiple cis-acting elements regulate the expression of the early T cell activation antigen CD69. *Eur.J.Immunol.* 32 (11). 3108-3117
125. Kim H.P. y Leonard W.J. (2002). The basis for TCR-mediated regulation of the IL-2 receptor alpha chain gene: role of widely separated regulatory elements. *EMBO J.* 21 (12). 3051-3059
126. Larochette N., Decaudin D., Jacotot E., Brenner C., Marzo I., Susin S.A. et al. (1999). Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp.Cell Res.* 249 (2). 413-421
127. Hossain K., Akhand A.A., Kawamoto Y., Du J., Takeda K., Wu J. et al. (2003). Caspase activation is accelerated by the inhibition of arsenite-induced, membrane rafts-dependent Akt activation. *Free Radic.Biol.Med.* 34 (5). 598-606
128. Kilpatrick D.C. (1999). Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. *Mol.Biotechnol.* 11 (1). 55-65
129. Vega L., Montes d.O., Saavedra R., y Ostrosky-Wegman P. (2004). Helper T cell subpopulations from women are more susceptible to the toxic effect of sodium arsenite in vitro. *Toxicology.* 199 (2-3). 121-128
130. Meng Z.Q. y Meng N.Y. (2000). Effects of arsenic on blast transformation and DNA synthesis of human blood lymphocytes. *Chemosphere.* 41 (1-2). 115-119
131. Stanciu L.A., Shute J., Holgate S.T., y Djukanovic R. (1996). Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected CD4+ and CD8+ human T cells following a four-step cell separation method including magnetic cell sorting (MACS). *J.Immunol.Methods.* 189 (1). 107-115
132. D'Souza W.N. y Lefrancois L. (2003). IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J.Immunol.* 171 (11). 5727-5735
133. Gupta S., Yel L., Kim D., Kim C., Chiplunkar S., y Gollapudi S. (2003). Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. *Mol.Cancer Ther.* 2 (8). 711-719
134. Burns L.A. y Munson A.E. (1993). Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD25 (IL-2R/p55). *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 265 (1). 178-186
135. Vahter M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology.* 181-182. 211-217
136. Chung J.S., Kalman D.A., Moore L.E., Kosnett M.J., Arroyo A.P., Beeris M. et al. (2002). Family correlations of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environ.Health Perspect.* 110 (7). 729-733
137. Pardoll D.M. y Topalian S.L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 10 (5). 588-594