

127
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE SECRECION DE
INTERLEUCINA. DOS (IL-2) EN LINFOCITOS
HUMANOS TRATADOS *in vitro* CON ARSENITO
DE SODIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

PAVEL MONTES DE OCA BALDERAS

DIRECTOR DE TESIS: MIBB. LIBIA VEGA LOYO.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Baulé
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Determinación de secreción de interleucina dos (IL-2) en linfocitos humanos tratados in vitro con arsenito de sodio"

realizado por Pável Montes de Oca Balderas

con número de cuenta 8824876-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

M.T.B.B. Libia Vega Loyo

Propietario

Propietario

Dra. María Eugenia Gensebatt Bonaparte

Suplente

Dr. Rafael Saavedra Duran

Suplente

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Dr. Fernando Ramos Reyes

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Toxicológica del
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma
de México, bajo la dirección de la M.I.B.B. Libia Vega Loyo.**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque directa e indirectamente le debo la mayor parte de mi educación.

A mi mamá porque con su ejemplo me ha enseñado que con esfuerzo, trabajo y sacrificio se alcanzan las metas que uno se propone.

A mi papá por los valores de honestidad, sencillez y justicia que me ha enseñado.

A mis hermanos Horacio (gracias por los 2 ml de sangre que me donaste) y Marco Antonio porque con ellos he crecido y aprendido muchas cosas.

A Alejandra por estar a mi lado estos cinco meses en los que creo he tenido el peor humor, y por todos los planes, que espero, se lleven a cabo.

A Libia por su dirección y comentarios, pero principalmente por ser una buena amiga, tolerante y comprensiva.

A mis revisores de tesis por sus valiosos comentarios Dra. Maricha, Dr. Emilio, Dr. Rafael, y Dr. Fernando Ramos.

A mis amigos Ricardo, Adrián, Fernando y Oquitzin.

A mis compañeros del Instituto por su apoyo Adriana, Esperanza, Montserrat, Rocío, Tsutsuy, MariCarmen, Mahara, Ana, Emilio, Daniel, Maricha, Luis (y por la sangre), Silvia, Aurora, Libia, Patricia R., Alfonso, Clelia, Octavio, Sulma, Luz, Ana, y a los que no me acuerdo por mi pésima memoria.

Agradesco a la Dra. Patricia Ostrosky por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Enrique Ortega Soto, por su colaboración, así como a Claudia, Rocío, Martha, Mariana, Claudia y Claudine.

Al Dr. Rafael Saavedra por el Contador de Centelleo y su valiosa donación de sangre.

A Ignacio Terrazas por el cosechador y los litros de sangre, así como a Mónica y Alejandro.

A las personas que me han enseñado cosas muy importantes Margarita, Silvia, todos mis maestros y maestras, a las personas del CETis que en realidad me han conocido y que han sido mis compañeros.

ÍNDICE

Abreviaciones

Resumen 1

Introducción

El Sistema Inmune 2

Los linfocitos T 3

La interleucina-2 y su receptor 6

Exposición a arsénico 10

Justificación 14

Hipótesis 15

Objetivo 16

Estrategia experimental 17

Material y métodos

Obtención de linfocitos 18

Cultivos de linfocitos 18

Determinación de la viabilidad 19

Determinación de proliferación 20

Determinación de IL-2 secretada

Cultivos de CTLL-2	20
Bioensayo de CTLL-2	21
Análisis estadístico	21
Resultados	
Viabilidad	22
Proliferación	23
Secreción de IL-2	23
Tablas	
Gráficas	
Discusión	25
Gráficas	
Bibliografía	31

Abreviaciones

[3H]-timidina	Timidina Triticada
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ARNhn	Ácido Ribonucleico heterogeneo nuclear
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
As	Arsénico
ATP	Adenosina tri-fosfato
CTL	Linfocito T Citotóxico
Cys	Cisteina
D.O.	Densidad Óptica
Fe	Fragmento cristalizable del anticuerpo
GaAs	Arsenuro de Galio
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor para IL-2
IFN	Interferón
JNK	Cinasa Janus
KDa	Kilodalton
M	Molar
Mnp	Proteína Activada en Mitosis
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIP	Proteína Inflamatoria para Macrófagos
NK	Células Asesinas Naturales
PHA	Fitohemaglutinina
PKC	Proteína Cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
TCD8+	Linfocito T CD8 positivo
TCD4+	Linfocito T CD4 positivo
TCR	Receptor de Célula T
Th	Linfocito T ayudador
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TsF	Factor Inductor de Supresión
SI	Sistema Inmune
STAT	Transductor de señal o Activador de Transducción
U/ml	Unidades por mililitro

RESUMEN

El arsénico es un contaminante ambiental ampliamente distribuido conocido como carcinogénico para el ser humano, aunque sus mecanismos de acción son muy poco conocidos. Puesto que se han observado alteraciones en la capacidad proliferativa de linfocitos expuestos *in vitro* e *in vivo* a compuestos arsenicales, se evaluó el efecto del arsenito de sodio *in vitro* sobre la capacidad de secreción de interleucina-2, tomando en cuenta la importancia que esta glucoproteína tiene en la progresión del ciclo celular de los linfocitos. Se hicieron cultivos de linfocitos circulantes de diez donadores, los cuales fueron tratados en fase G0 por 24 h con arsenito de sodio en distintas concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 μM) y se estimularon con fitohemaglutinina (PHA) por 24 h. Los cultivos fueron cosechados y se evaluó la viabilidad (ensayo de MTT), la proliferación (incorporación de [^3H]-T) y la cantidad de interleucina-2 (IL-2) secretada (bloensayo de CTL-2). Se observó que las concentraciones empleadas de arsenito de sodio no fueron directamente citotóxicas para la mayoría de los cultivos, ya que se observaron alteraciones en la viabilidad no mayores al 15%, con excepción de uno de los individuos en el que la viabilidad se redujo cerca del 60%. Se observó susceptibilidad individual en la capacidad proliferativa de las células, ya que las concentraciones 0.5 y 1 μM de arsenito de sodio redujeron la capacidad proliferativa de los cultivos de 30 a 75%, mientras que las demás concentraciones provocaron respuestas diferentes en los individuos. El tratamiento con arsenito de sodio produjo diferencias inter e intraindividuales en la cantidad de IL-2 secretada, pudiéndose observar decrementos del 30 al 95% en 5 de los donadores, incrementos del 30 al 80% en dos de los donadores, o ningún efecto en otros tres. Estos resultados indican que el arsenito de sodio puede modificar la capacidad proliferativa de los linfocitos, así como su capacidad de secretar IL-2, dependiendo de factores aún sin determinar inherentes al individuo. Además es evidente que existe una alta susceptibilidad individual al arsénico, y que uno de los individuos participantes en este estudio presentó una mayor sensibilidad al efecto del arsenito de sodio que el resto de los individuos.

INTRODUCCIÓN

EL SISTEMA INMUNE

En el ambiente los organismos están sometidos a distintos factores que determinan su continuidad como especie (por ejemplo el clima, la competencia por los recursos, las enfermedades, los contaminantes químicos, etc). Es por eso que aquellos que han desarrollado mecanismos que les permiten adecuarse a los distintos factores tienen una mayor probabilidad de sobrevivencia y por ello, de dejar progenie y mantener su especie. El medio ambiente contiene una gran variedad de microbios infecciosos (virus, bacterias, hongos, protozoarios y parásitos multicelulares), que provocan daño, y que si se multiplicaran descontroladamente, matarían eventualmente a su huésped. Algunos organismos cuentan con el sistema inmune (SI), que es una compleja red de células, tejidos y órganos que responde a la presencia de agentes infecciosos o de células infectadas que presentan antígenos extraños, y que se encarga de eliminarlos y de minimizar el daño que provocan (Abbas et al, 1991; Roitt et al, 1996).

Las células que están directamente relacionadas y que caracterizan la función inmune son varias: los linfocitos, los macrófagos, los leucocitos polimorfonucleares, etc. Todas éstas se derivan de las células madre (stem cells) que se originan en la médula ósea de los organismos adultos, o en el hígado de los organismos prenatales, de donde pueden o no migrar hacia otros órganos linfáticos para diferenciarse. Una vez maduros los linfocitos y las células accesorias, pueden moverse hacia diferentes destinos, como por ejemplo el sistema circulatorio, en donde se mantienen en constante movimiento; o a los tejidos linfáticos secundarios, como el bazo, los nódulos linfáticos y todos los

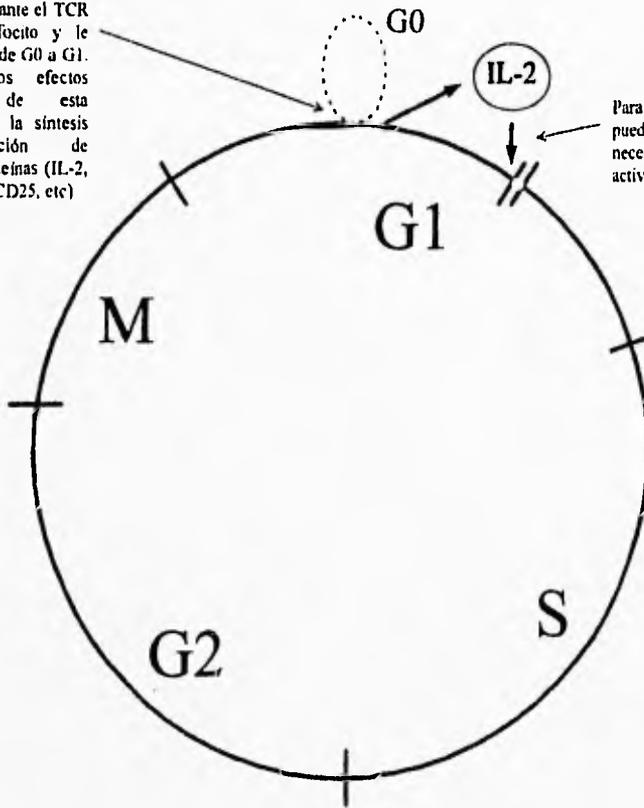
diversos tejidos del organismo (excepto el tejido nervioso), en donde pueden acumularse para optimizar las interacciones celulares necesarias para la activación de la respuesta inmune (Abbas et al, 1991; Roitt et al, 1996).

Existen dos clases principales de linfocitos en el SI los T y los B. Los linfocitos T se diferencian en el timo y los linfocitos B lo hacen en la médula ósea (o en la Bursa de Fabricius en las aves). Aunque estos dos tipos de linfocitos son prácticamente indistinguibles en forma y tamaño cuando se observan por medio de microscopía convencional, molecularmente son bastante diferentes, particularmente en el tipo de receptores membranales que presentan, que están determinados por la distinta función que desarrollan estos linfocitos que depende principalmente del reconocimiento de moléculas externas por medio de sus receptores membranales. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir inmunoglobulinas, las cuales se encuentran expuestas en su membrana, y cuando estos reconocen un antígeno se inicia la secuencia de activación de las células B, que culmina con el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos. Por todo esto se reconoce que las células B están directamente relacionadas con la inmunidad humoral (Abbas et al, 1991; Roitt et al, 1996).

Los linfocitos T

Los linfocitos T están divididos molecular y funcionalmente en dos subpoblaciones principales: los linfocitos T ayudadores (TCD4+ o Th) y los citotóxicos (TCD8+ o CTL). Cuando los linfocitos TCD4+ reconocen por medio del receptor de célula T (TCR) un antígeno específico asociado al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) en la membrana de una célula presentadora de antígeno (APC), el linfocito es capaz de entrar a la fase G1 del ciclo celular (Fig. 1) y de secretar factores de crecimiento protéicos llamados linfocinas (interferón-gamma; IFN- γ , interleucina-2; IL-2, interleucina-3; IL-3, factor

El reconocimiento de un antígeno mediante el TCR activa al linfocito y le permite pasar de G0 a G1. Uno de los efectos tempranos de esta activación es la síntesis y/o secreción de diferentes proteínas (IL-2, IL-4, TNF α , CD25, etc)



Para que el linfocito pueda pasar a la fase S necesita que su IL-2R sea activado por IL-2.

Figura 1. Esquema del ciclo celular de los linfocitos T. Cuando la célula se encuentra en la fase G0 necesita ser activada por un antígeno mediante su TCR para que entre en fase G1, esto provoca el encendido de diversos genes, entre los que se encuentra el de la IL-2. La IL-2 secretada por el linfocito puede ser un factor de crecimiento tanto autócrino como parácrino, y es necesaria para la progresión de G1 a S en el ciclo celular de los linfocitos.

de necrosis tumoral-beta; TNF- β . etc) cuya función es la amplificación de la respuesta inmune mediante la activación, proliferación, atracción y diferenciación de los mismos linfocitos T, los B, los macrófagos, y demás células del SI (Roitt et al, 1996). Se ha encontrado que no todos los linfocitos TCD4+ una vez diferenciados secretan las mismas citocinas, sino que existen patrones específicos de secreción: los linfocitos Th conocidos como Th1 secretan IL-2 e IFN- γ , y Th2 que secretan IL-4 e IL-5 (Mosmann et al, 1986). Se ha observado que hay ciertas subpoblaciones de células T que pueden funcionar también como reguladoras de la respuesta humoral mediante la secreción de factores inductores de supresión (TsF) (Devens et al, 1991). Por su parte los linfocitos TCD8+ se encargan de lisar a las células que presentan un antígeno específico asociado al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) (por ejemplo las células tumorales). Por estas características se reconoce que los linfocitos T están encargados de mediar la inmunidad celular (Abbas et al,1991; Roitt et al, 1996).

Como ya se mencionó anteriormente, la interacción entre los grupos celulares es necesaria para la activación del SI. Este tipo de interacciones se lleva a cabo por medio de la secreción y el reconocimiento de distintos tipos de moléculas que funcionan básicamente de dos maneras: como señales intercelulares, o como receptores membranales capaces de reconocer dichas señales (Clark y Ladbetter, 1994; Abbas et al,1991; Roitt et al, 1996). Las moléculas que funcionan como señales intercelulares son llamadas en general citocinas y son de naturaleza proteica. Dependiendo del tipo celular que las produzcan, son llamadas monocinas, si son secretadas por los macrófagos, o linfocinas, si éstas son producidas por los linfocitos T, aunque en realidad hay otros tipos celulares que también son capaces de secretarlas (Abbas et al,1991; Roitt et al, 1996).

Actualmente se conocen un gran número de citocinas. Éstas se han clasificado según el efecto que provocan al interaccionar con sus receptores membranales específicos; un grupo se compone de las citocinas encargadas de proteger contra infecciones virales (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc). Otro grupo es el de las que inician reacciones inflamatorias en respuesta a virus o bacterias conocidas como quimiocinas (IL-8, MIP- α , etc). Un último grupo de citocinas es el conformado por las que regulan la activación, crecimiento y diferenciación de los linfocitos (IL-2, IL-4, IL-12, etc) (Fig. 2) (Abbas et al, 1991; Roitt et al, 1996).

Pero esta compleja red de células, tejidos y órganos que conforman al SI, no siempre es capaz de llevar a cabo la respuesta inmune ante cualquier cuerpo extraño que penetre en el organismo como se esperaría, ya que existen diferentes factores fisiológicos y ambientales que pueden provocar ya sea deficiencias o aumento de la respuesta inmune de un organismo. Dentro de los factores fisiológicos, que se deben principalmente a defectos intrínsecos del metabolismo en su mayoría determinados genéticamente, se encuentran por ejemplo los relacionados con los cambios en concentraciones de diferentes tipos de hormonas en la sangre circulante. Se ha encontrado por ejemplo que la presencia de glucocorticoides suprime la respuesta inmune humoral y celular (Kawahara et al, 1990; Kavelaars et al, 1995); también se ha demostrado que la inmunotolerancia o parálisis del SI puede ser provocada por la presencia en la sangre de anticuerpos que se unen a receptores de antígenos de las células inmunocompetentes (Abbas et al, 1991). Además, hay una gran cantidad de enfermedades asociadas a deficiencias en los linfocitos T y B (Inmunodeficiencia combinada severa, Ataxia telangiectasia hereditaria, Inmunodeficiencia variable común, Agammaglobulinaemia ligada al X, etc) (Roitt et al, 1996). Otro factor fisiológico individual que sin duda modifica la respuesta inmune es la edad del organismo (Negoro et al, 1989; Kavelaars et al, 1995). Por su parte los factores ambientales que pueden modificar la respuesta inmune son por ejemplo las radiaciones (Kripke, 1994), la malnutrición (Kelley y Benedich, 1996), el consumo de drogas, medicamentos o la

CITOCINA	PESO MOLECULAR (Da)	CÉLULAS SECRETORAS	PRINCIPAL CÉLULA BLANCO	EFECTOS PRINCIPALES
IFN- γ	40-5000 (dímero)	células T, células NK	linfocitos, monocitos, células tisulares	inmunoregulación, diferenciación de células B, acción antiviral
IL-1 α IL-1 β	33000 (precursor) 17500 (maduro)	monocitos, células dendríticas, algunas células B, fibroblastos, células epiteliales, endotelio, astrociitos, macrófagos	timocitos, neutrófilos, células B y T, células tisulares	inmunoregulación, inflamación, fiebre
IL-2	15000	células T, células NK	células B y T, monocitos	proliferación, activación
IL-3	15000	células T	células "stem", progenitoras	factor de estimulación de colonia pan-específico
IL-4	15000	células T	células B, células T	división, diferenciación
IL-5	20000	células T	células B, eosinófilos	diferenciación
IL-6	20000	macrófagos, células T, fibroblastos, algunas células B	células B y T, timocitos, hepatocitos	diferenciación, síntesis de proteínas de fase aguda
IL-8 (fartilia)	8000	macrófagos, células de la piel	granulocitos, células T	quimiotaxis
TNF α	50000 (trímero)	macrófagos, linfocitos	fibroblastos, endotelio	inflamación, catabolismo, fibrosis, producción de otras citocinas (IL-1, IL-6, GM-CSF) y moléculas de adhesión
TNF β (linfotóxina)	50000 (dímero)			

Figura 2. Cuadro de las citocinas mejor conocidas. (Tomado de Roitt et al, 1996)

presencia de algunas moléculas orgánicas (Shevach, 1985; Schoental, 1985), el grado de estrés al que el individuo esté sometido (Glaser et al, 1990), la exposición a agentes químicos, la previa infección con virus, bacterias, o parásitos, etc (Abbas et al, 1991; Roitt et al, 1996)

LA INTERLEUCINA-2 Y SU RECEPTOR

Una de las citocinas más conocidas hoy en día, y que se sabe tiene un papel central en la respuesta inmunológica es la Interleucina 2 (IL-2) (Swain, 1991), conocida anteriormente como factor de crecimiento de células T y que pertenece al grupo de las encargadas de regular la activación, crecimiento y diferenciación de algunas células del SI (Smith, 1988).

El gen que codifica para esta citocina consta de 5737 pares de bases en el hombre y se encuentra localizado en el locus 4q26-27 de nuestro genoma. El resultado de la transcripción de este gen es un ARNhn con tres intrones y cuatro exones los cuales después de la maduración, dan como resultado un ARNm de 844 bases que al final se traduce en una proteína de aproximadamente 17 kDa y 153 aminoácidos de secuencia (GenBank, Acc: J002264; GenBank, Acc: X01586). La estructura cristalográfica de la proteína ha sido dilucidada hasta los 3.0 Å de resolución, revelando que está formada principalmente por α hélices antiparalelas sin segmentos en estructura secundaria β (Brandhuber et al, 1987) y que entre los residuos de aminoácidos 58 y 105 se forma un puente disulfuro (Cys-Cys), que si se reduce, se elimina la actividad biológica de la proteína, lo que indica que la estructura terciaria de la IL-2 es muy importante para conservar su funcionalidad (Ciardelli et al, 1987).

Esta glucoproteína es sintetizada principalmente por los linfocitos TCD4+ aproximadamente 50 min después de que el linfocito ha sido activado, es decir

cuando pasa de la fase G0 a G1 del ciclo celular. Cuando el linfocito T se activa en respuesta a un antígeno, el complejo conocido como CD3 formado por varias proteínas y el cual está asociado al TCR, inicia una cascada de reacciones en la que se activan una gran variedad de sustratos como Lck, ZAP-70, PLC γ 1, p36, p75, Grb2, Sos, p21ras, Raf-1, PKC, etc. (Fig. 3), lo que aunado a la activación de receptores como CD28 y CTLA-4 provoca la activación de diversos factores de transcripción como AP-1, NF-AT, NFAT-1, etc, dando lugar a la transcripción en distintos tiempos de un gran número de genes entre los que se encuentran los que codifican para IFN- γ , IL-2, p28, IL-3, IL-6, c-myb, etc. (Crabtree, 1989; Izquierdo et al, 1995; Robey y Allison, 1995)

Una vez secretada la IL-2 no sólo actúa en las células del SI como los linfocitos B, los linfocitos TCD8+, las NK, etc, sino que además lo hace en los mismos linfocitos TCD4+, formándose así una retroalimentación positiva que favorece tanto la síntesis de IL-2 como también la síntesis de la cadena p55 del receptor para IL-2 (CD 25), por lo que la IL-2 es reconocida como el factor de crecimiento autócrino más importante de los linfocitos (Stern y Smith, 1986; Smith, 1988; Swain, 1991).

Para que la IL-2 lleve a cabo todas sus funciones, es necesario que interactúe con el receptor para IL-2 presente en la membrana de las células del SI, el cual se encarga de iniciar la cascada de señales dentro de la célula. Este receptor está conformado por al menos tres subunidades que poseen *per se* una baja afinidad por el ligando; la subunidad α (CD 25) de 55 kDa posee una afinidad de 1×10^{-8} M, la subunidad β de 75 kDa con afinidad de 1×10^{-7} M, que se ha encontrado que es la que posee el dominio citoplásmico capaz de transducir la señal por medio de la fosforilación de los residuos de tirosina 338 y 510 y de acelerar la internalización del receptor cuando interactúa con el ligando (Smith, 1989; Kono et al, 1993; Minami et al, 1993; Goldsmith et al, 1995); y una tercera

subunidad de 64 kDa, que se ha encontrado asociada a receptores de otras citocinas (IL-4, IL-7, etc) por lo que se conoce como cadena común y que por si sola no tiene afinidad con el ligando, pero asociada a la cadena β ayuda a elevar su afinidad a 1×10^{-9} M. Al interactuar estos tres polipéptidos por fuerzas no covalentes se forma el receptor para IL-2 de alta afinidad (1×10^{-11} M) (Minami et al, 1993). La transducción de la señal que la cadena β lleva a cabo está relacionada con la fosforilación de varios tipos de sustratos intracelulares, incluyéndose ella misma, otras tirosinas cinasas de las familia src y Jak's, además de moléculas como Shc, Grb2, Sos, p75, p21ras, Raf-1, etc., lo que lleva a la inducción de proto-oncogenes como c-myb, c-jun, c-myc, c-fos, etc. y por consecuencia a la síntesis de un gran número de proteínas (Fig. 4) (Minami et al, 1993; Howard et al, 1995; Izquierdo et al, 1995).

La vida media en la membrana del receptor de alta afinidad, en ausencia de IL-2, es de aproximadamente 150 min, pero en presencia de IL-2 su vida media se reduce a 15 min. Debido a esto y al tiempo que tarda en sintetizarse y enviarse a la membrana nuevo receptor, la concentración en la membrana disminuye de 50 a 60% en el par de horas siguiente a la presencia inicial de IL-2 en el medio, recuperándose y elevándose posteriormente (Duprez et al, 1988; Smith, 1989). Se ha encontrado que la internalización del complejo ligando-receptor es requerida para que la IL-2 promueva el crecimiento de líneas celulares dependientes de IL-2 (Kumas et al, 1987), y no se ha encontrado que este complejo sea reciclado a la membrana una vez que se ha sido internalizado a través de endosomas, los que se fusionan en el citoplasma con lisosomas en donde son degradados por proteasas ácidas (Smith, 1989).

Se ha demostrado que cuando el linfocito TCD4+ se encuentra en la fase G0 del ciclo celular, presenta en la membrana celular aproximadamente 500 cadenas β que pueden llegar a interactuar con la IL-2, 5000 cadenas γ y muy

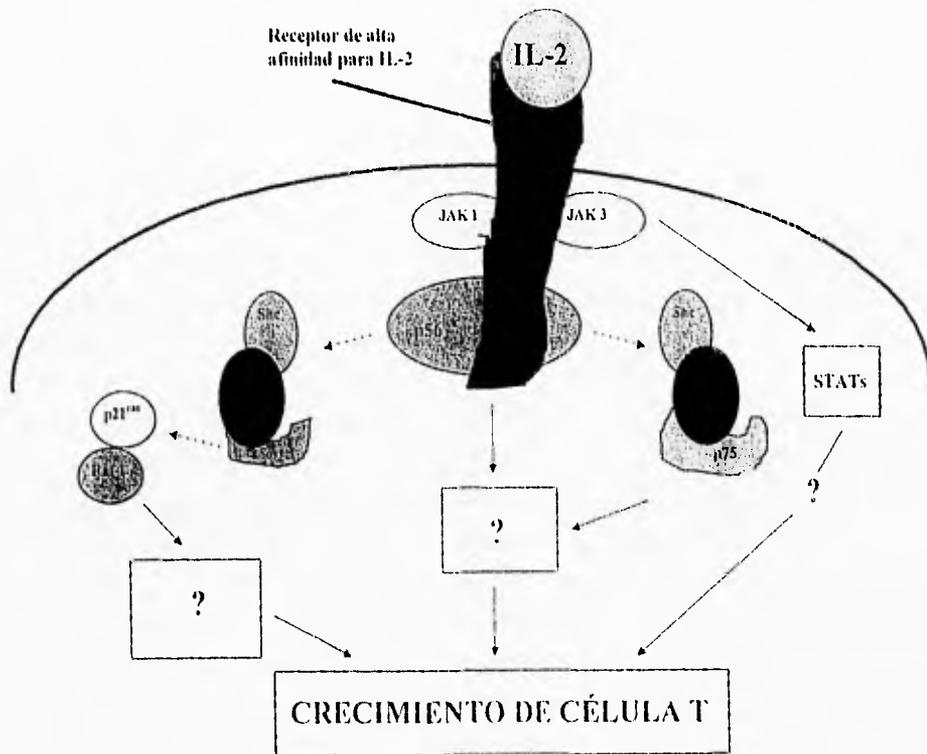


Figura 4. Cascada de señalización inducida por la activación del receptor para IL-2. Esta cascada de señales puede llegar al núcleo directamente mediante la fosforilación de transductores de señal y de activadores de transcripción (STATs) mediada por cinasas de la familia Janus (JAK). Otra vía posible se presenta mediante la activación de tirosina cinasas de la familia src (p56^{lck}), la cual puede fosforilar moléculas como Shc, que se asocia a proteínas como Grb2. Esta molécula puede asociarse a dos vías diferentes de señalización, una mediante la proteína Sos, que a su vez actúa sobre p21ras y Raf-1, o mediante la proteína p75. Estas dos vías pueden estimular a cinasas MAPK y ERK2 que actúan directamente sobre factores de transcripción en el núcleo. (Tomado de Izquierdo et al. 1995)

pocas cadenas α , pero cuando el linfocito es activado, las concentraciones en la membrana de las cadenas α y β se incrementan en distintas proporciones llegando a tener en el nivel máximo hasta 50000 cadenas α , 5000 cadenas β , mientras que las cadenas γ no aumentan en número. De esta manera el número de receptores de alta afinidad se eleva paulatinamente y se forma una retroalimentación positiva hasta alcanzar el nivel máximo de secreción de IL-2 y de concentración en membrana del receptor de alta afinidad, lo que sucede de 4 a 6 horas después de la activación del linfocito. Se ha encontrado que la interacción de la IL-2 con su receptor de alta afinidad aumenta particularmente la síntesis de cadenas α más que de cadenas β , elevando así la cantidad de receptor de alta afinidad en la membrana (Smith, 1989; Roitt et al, 1996).

La IL-2 es un factor necesario para la progresión del ciclo celular de los linfocitos de la fase G1a a la fase S (Klaus y Hawrylowicz, 1984), aumentando la expresión del proto-oncogen *c-myc* hasta seis o siete veces en comparación al nivel basal (Stern y Smith, 1986). La cantidad de IL-2 secretada por los linfocitos TCD4+ es una determinante de la magnitud de la respuesta inmune (Weinberg y Parkman, 1990; Swain, 1991), ya que a) puede participar en la inmunoregulación evitando la respuesta de cierto tipo de células activadas por un antígeno (Scell y Fitch, 1989), b) estimula el crecimiento de las células NK aumentando su función citolítica, c) actúa junto con otras interleucinas sobre los linfocitos B promoviendo su desarrollo y diferenciación, así como la secreción de anticuerpos al plasma, y d) puede tener una actividad sinérgica junto con otras citocinas (p.ej. la IL-12) e inducir la secreción de IFN- γ por parte de las células TCD8+ y NK (Fig. 5) (Swain, 1991; Abbas et al, 1991; Roitt et al, 1996). En células tumorales se ha encontrado que su producción de IL-2 promueve una respuesta antitumoral efectiva, lo que se ha aprovechado en el diseño de inmunoterapias contra el cáncer (Fearon et al, 1990; Counoyer y Caskey, 1993; Pardoll, 1993). Se han encontrado cuadros

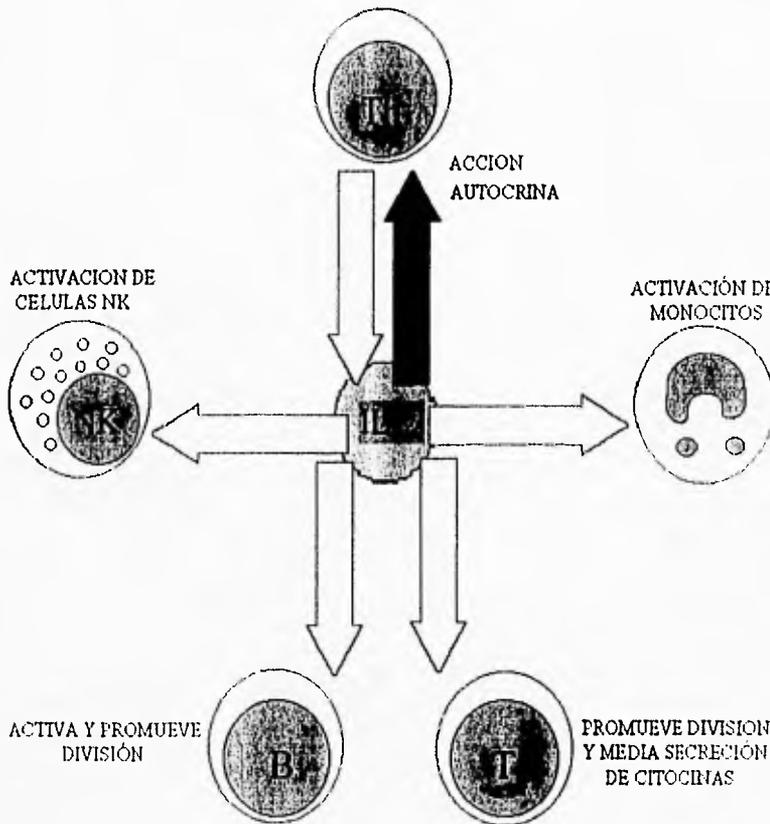


Figura 5. Acciones de la IL-2. La IL-2 es secretada por los linfocitos Th. Además de su papel esencial de promover la división celular de las células T y la secreción de citocinas, también promueve el crecimiento de las células B. La activación de los monocitos y las células NK es importante en la amplificación de la respuesta inmune. (Tomado de Roitt et al, 1996)

clínicos de inmunodeficiencia combinada severa debidos a defectos en la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T (Weinberg y Parkman, 1990).

EXPOSICIÓN A ARSÉNICO

Para muchas especies, incluyendo al ser humano, la exposición a agentes químicos es uno de los mayores problemas que enfrentan debido a que existe una gran variedad de elementos y sustancias químicas distribuidos en la naturaleza, formando compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos, sobre todo debido al alto nivel de industrialización de la sociedad humana. Las fábricas que se encargan de manufacturar la gran gama de productos satisfactorios de los que hoy en día disponemos, producen y emplean una gran cantidad de sustancias químicas que son potencialmente tóxicas para los organismos y que son desechadas al medio ambiente.

Un ejemplo claro de este tipo de sustancias tóxicas es el arsénico (As). Este metaloide se encuentra en la naturaleza formando parte de minerales como los arsenuros de cobre, níquel, hierro, o como sulfuro u óxido de As; puede además, encontrarse en forma de arseniato (arsénico pentavalente, As V^+) o de arsenito (arsénico trivalente, As III^+) en fuentes de agua que estén en contacto con sedimentos ricos en sales; o bien, formando parte de compuestos orgánicos producto del metabolismo de algunos seres vivos. El As se emplea hoy en día de varias formas en la industria: en la producción de pesticidas cuyos compuestos activos contienen As; en plantas fundidoras de cobre, oro, plomo y antimonio; en plantas productoras de As; en plantas generadoras de electricidad por medio de la combustión de carbón mineral; en los laboratorios que se dedican a la fabricación de medicamentos (principalmente antiparasitarios) que contienen As; y recientemente en fábricas de componentes electrónicos que usan el arsenuro de galio (GaAs) como semiconductor (Bencko, 1987; Vahter, 1988, Diaz-Barriga et al.

1993; Burns y Munson, 1993). La amplia distribución del As lo hacen un compuesto al cual ciertas poblaciones humanas están expuestas constantemente, ya sea por laborar en las diferentes industrias que lo emplean en sus medios de producción; por el consumo de alimentos (principalmente marinos) que lo contienen en forma de compuestos orgánicos (Aposhian, 1989), o por la ingestión de agua con elevadas cantidades de As (Gonsebatt et al, 1994); por respirar en un ambiente contaminado por las diferentes industrias que lo emplean: o bien por el uso de medicamentos antiparasitarios que lo contengan (Goyer, 1991).

Diversos estudios epidemiológicos en poblaciones humanas han demostrado que la exposición crónica a diversos compuestos arsenicales provoca daños a la salud del ser humano, algunos de ellos severos. Se han descrito efectos iatrogénicos, principalmente a nivel del sistema nervioso central (Bencko, 1987), sobre todo encefalopatías y atrofia del nervio óptico; además, en animales experimentales alimentados con dosis altas de ácido arsánico, se producen efectos tóxicos a nivel de sistema nervioso (Bencko, 1987). Por otro lado, la intoxicación aguda con As inorgánico produce distintos tipos de lesiones, la principal es el daño al sistema digestivo que provoca vómito y diarrea, además de calambres, edema facial, anomalías cardíacas, y si se sobrevive, problemas sensoriales posteriores del sistema nervioso periférico (WHO, 1981). La exposición subaguda a compuestos de As en el aire daña las membranas mucosas del sistema respiratorio y la piel, a lo que se suma conjuntivitis y dermatitis (WHO, 1981). La exposición crónica por inhalación provoca daño al tracto respiratorio, y se ha asociado con la elevación en la tasa de nacidos muertos y abortos (Börzsönyi et al., 1992). La exposición crónica a As también produce alteraciones en las funciones hepáticas (Bencko, 1987). La ingestión crónica de agua o medicamentos con As produce alteraciones cutáneas y se ha asociado con distintos tipos de cáncer, sobre todo en piel, vejiga, hígado y riñón, o broncogénica cuando se está expuesto por inhalación (IARC, 1987; Cheng y Wang, 1990; Bates et al, 1992).

Se han realizado estudios con linfocitos de individuos expuestos crónicamente a As inorgánico por el consumo de agua contaminada, y se ha encontrado que la cinética del ciclo celular es más lenta y la respuesta a mitógenos más reducida que las encontradas en linfocitos de individuos no expuestos, además de que también se ha confirmado la capacidad del As como genotóxico (Ostrosky-Wegman et al., 1991; Gonsebatt et al., 1994). En linfocitos tratados *in vitro* con arsenito de sodio Gonsebatt y cols (1992) encontraron efectos inhibitorios sobre su capacidad proliferativa. Por otro lado, se ha demostrado que la exposición a GaAs suprime la producción de anticuerpos, además de inhibir la proliferación de los linfocitos T y alterar la expresión de la cadena α del receptor para IL-2 (CD25) (Burns y Munson, 1993).

Se ha encontrado en estudios realizados con ratones con infecciones virales expuestos a compuestos arsenicales dos tipos de efectos en el sistema inmune. Gainer y Pry (1972) encontraron que la susceptibilidad en ratones infectados con el virus de pseudorabia aumentaba cuando eran tratados con arsenito de sodio, trióxido de arsénico y arsenato de sodio, mientras que la mortalidad aumentaba de 2 a 9 veces en ratones infectados con el virus de la encefalomiocarditis y expuestos a arsenito de sodio o ácido 4-hidroxil-3-nitrobenzenarsónico, pero no así con ácido p-arsanílico; además en ratones infectados con el virus de "Western" encefalitis y tratados con arsenito de sodio la mortalidad se vió reducida.

Algunos de los mecanismos bioquímicos por medio de los que el As actúa han sido dilucidados. Se ha encontrado que el As (III⁺) lleva a cabo su acción citotóxica por medio de su reacción con los grupos tiol, lo cual provoca la formación de enlaces estables entre los grupos tiol de las proteínas y el As, y si las proteínas son enzimas, su actividad catalítica puede ser inhibida (Aposhian, 1989). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que el As puede provocar

amplificación génica (Lee et al., 1988). El mecanismo bioquímico por el cual esto ocurre aún no está bien definido. También se ha probado que cuando el As (V^+) está presente, la célula es incapaz de producir por medio de la glicólisis la cantidad de ATP suficiente para llevar a cabo sus funciones. Se cree que esto se debe a que el As (V^+) es similar en estructura al fosfato inorgánico, y que puede sustituirlo en diversas reacciones metabólicas (Aposhian, 1989).

JUSTIFICACIÓN

Dadas las observaciones hechas en varios estudios que han reportado un decremento en la capacidad proliferativa de linfocitos activados con fitohemaglutinina expuestos *in vivo* e *in vitro* a diferentes compuestos arsenicales, a que en poblaciones expuestas a dosis altas de arsénico en el agua potable se presentan índices más elevados de algunas enfermedades que en poblaciones no expuestas; es muy importante entender los mecanismos mediante los cuales los compuestos arsenicales son capaces de reducir la capacidad proliferativa de las células linfocitarias.

HIPÓTESIS

En linfocitos humanos expuestos tanto *in vivo* como *in vitro* a compuestos arsenicales se ha observado una disminución en su capacidad proliferativa en respuesta a un estímulo mitogénico, por lo que es posible que este efecto se deba a alteraciones en los procesos de activación del linfocito, entre los cuales se encuentra la secreción de IL-2. Tomando en cuenta la importancia de esta glucoproteína en la progresión de G1 a S en el ciclo celular del linfocito.

OBJETIVO

El objetivo que persigue este estudio es evaluar el efecto del arsenito de sodio sobre la capacidad de secreción de IL-2 de linfocitos humanos, tratados in vitro por 24 horas en la fase G0 del ciclo celular y estimulados por 24 horas con fitohemaglutinina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.- Determinación de la viabilidad de cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* en fase G0 por 24 horas con arsenito de sodio y estimulados por 24 horas con fitohemaglutinina.

2.- Determinación de la capacidad proliferativa de cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* en fase G0 por 24 horas con arsenito de sodio y estimulados por 24 horas con fitohemaglutinina.

3.- Determinación de la cantidad de IL-2 secretada al medio de cultivo de linfocitos humanos tratados *in vitro* en fase G0 por 24 horas con arsenito de sodio y estimulados por 24 horas con fitohemaglutinina.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LINFOCITOS

Por medio de jeringas (TERUMO) heparinizadas (PISA) se realizó venopunción para obtener sangre periférica de 6 donadores de clase media, de sexo masculino, entre 20 y 35 años, sanos y que no hubieran consumido medicamentos o sufrido de enfermedades durante la semana previa a la extracción. La sangre de cada donador se centrifugó por 30 min a 1600 rpm en un gradiente de Ficoll-Hypaque (SIGMA), y posteriormente se separaron de ella el suero autólogo y los linfocitos, los que se lavaron 2 veces con medio RPMI-1640 (SIGMA) a 37°C. En seguida se determinó la cantidad y viabilidad de los linfocitos obtenidos mediante una tinción con azul tripano (SIGMA) para posteriormente completar la solución de células obtenidas con RPMI-1640 suplementado con aminoácidos no esenciales (dilución 1:100 del stock) (SIGMA) y 2 mM de L-glutamina (GIBCO) con pH 6.8-7 y a 37°C, hasta llegar a una concentración final de 1×10^6 linfocitos/ml.

CULTIVOS DE LINFOCITOS

En cajas de plástico estériles de 24 pozos con capacidad de 3 ml cada uno (COSTAR) se elaboraron cultivos con las células extraídas de cada donador, colocando 1×10^6 linfocitos, 10% de suero autólogo y RPMI-1640 hasta tener un volumen final de 2 ml por cultivo, por cada concentración experimental de arsenito de sodio. Simultáneamente se hicieron seis cultivos extras de cada tratamiento para determinar la viabilidad y proliferación en placas de 96 pozos (COSTAR), colocando 1×10^5 linfocitos, 10% de suero autólogo y RPMI-1640 suplementado,

hasta tener un volumen final de 200 μ l. Los tratamientos se prepararon con arsenito de sodio (NaAsO₂) (SIGMA) disuelto en agua destilada para tener cinco concentraciones finales diferentes (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 μ M).

Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y después de 24 horas de tratamiento con arsenito de sodio, los cultivos fueron estimulados con fitohemaglutinina (PHA) en dilución 1:40 del stock (GIBCO), con excepción del control negativo. Para evaluar la proliferación celular de los cultivos, les fue adicionado 1 μ Ci de [³H]-timidina (DUPONT) 4 horas después de la estimulación. La viabilidad, proliferación y secreción de IL-2 de los cultivos se determinó 24 horas después de la estimulación con PHA.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD

La viabilidad de los cultivos se evaluó mediante el ensayo de MTT. A cada cultivo de la placa de 96 pozos (más tres pozos extras usados como blancos) se les agregó 10 μ l de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (SIGMA) disuelto previamente en amortiguador de fosfatos (5 mg MTT/ml); posteriormente los cultivos se incubaron por 4 h en cámara húmeda a 37 °C y 5% de CO₂. Después de la incubación a cada cultivo se le añadieron 100 μ l de una solución preparada con 50 gr de lauryl sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) disueltos en 0.4 ml de ácido clorhídrico al 38% (BAKER) y 500 ml de agua destilada. Finalmente la placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar la disolución de los cristales de MTT, al final de los cuales se procesó en un lector de ELISA (BIORAD) a una longitud de onda de 550 nm.

hasta tener un volumen final de 200 μ l. Los tratamientos se prepararon con arsenito de sodio (NaAsO₂) (SIGMA) disuelto en agua destilada para tener cinco concentraciones finales diferentes (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 μ M).

Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y después de 24 horas de tratamiento con arsenito de sodio, los cultivos fueron estimulados con fitohemaglutinina (PHA) en dilución 1:40 del stock (GIBCO), con excepción del control negativo. Para evaluar la proliferación celular de los cultivos, les fue adicionado 1 μ Ci de [³H]-timidina (DUPONT) 4 horas después de la estimulación. La viabilidad, proliferación y secreción de IL-2 de los cultivos se determinó 24 horas después de la estimulación con PHA.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD

La viabilidad de los cultivos se evaluó mediante el ensayo de MTT. A cada cultivo de la placa de 96 pozos (más tres pozos extras usados como blancos) se les agregó 10 μ l de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (SIGMA) disuelto previamente en amortiguador de fosfatos (5 mg MTT/ml); posteriormente los cultivos se incubaron por 4 h en cámara húmeda a 37 °C y 5% de CO₂. Después de la incubación a cada cultivo se le añadieron 100 μ l de una solución preparada con 50 gr de lauryl sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) disueltos en 0.4 ml de ácido clorhídrico al 38% (BAKER) y 500 ml de agua destilada. Finalmente la placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar la disolución de los cristales de MTT, al final de los cuales se procesó en un lector de ELISA (BIORAD) a una longitud de onda de 550 nm.

DETERMINACIÓN DE PROLIFERACIÓN

Los cultivos para determinación de proliferación se cosecharon en papel filtro con un cosechador de células semi-automático (SKATRON), el cual se incluyó en líquido de centelleo (LKB) para evaluar las cpm en un contador de centelleo Betaplate (WALLAC).

DETERMINACION DE IL-2 SECRETADA

CULTIVOS DE CTLL-2

Los cultivos de células CTLL-2 se mantuvieron en cajas de 75 ml (COSTAR) en cámara húmeda a 37 °C y 5% de CO₂ con 5 ml de medio RPMI-1640 suplementado aminoácidos no esenciales (dilución 1:100 del stock), 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sodio (GIBCO), 50 µM de β-mercaptoetanol (BIORAD), 10 unidades de penicilina/ml, 0.01 mg/ml de estreptomicina (GIBCO), y 10% de suero fetal bovino inactivado (GIBCO), a pH 6.8 - 7. Para estimular la proliferación de estas células se agregó 1 unidad de IL-2 recombinante humana (BOEHRINGER) por ml de cultivo. Cada tercer día se hicieron diluciones 1:5 de los cultivos celulares con medio RPMI-1640 suplementado para CTLL-2, adicionando además IL-2 en la concentración antes mencionada.

Cuando estas células se emplearon para el bioensayo de determinación de IL-2 fue necesario eliminar la IL-2 existente en el cultivo, lo que se logró lavando las células con RPMI-1640 a 37 °C, e incubándolas posteriormente durante 2 horas en cámara húmeda a 37 °C y 5% de CO₂, y un segundo lavado final con RPMI-1640 suplementado para CTLL-2 a 37 °C.

BIOENSAYO DE CTLL-2

Se hicieron cultivos por triplicado en cajas de 96 pozos con 1×10^4 células en 100 μ l de RPMI-1640 suplementado para CTLL-2, a estos cultivos se les agregó 100 μ l de sobrenadante obtenido de los cultivos experimentales de linfocitos, en diluciones 1:10 y 1:20

Los cultivos se mantuvieron en cámara húmeda a 37 °C y 5% de CO² por 48 horas y 20 horas antes de la cosecha se añadió 0.5 μ Cl de [³H] timidina a cada pozo. Las células se cosecharon en papel filtro con un cosechador de células y posteriormente éste fue incluido en líquido de centelleo para evaluar en un contador de centelleo Betaplate las cpm incorporadas por los núcleos celulares.

También se elaboraron cultivos de células CTLL-2 a los que se les añadió IL-2 recombinante humana (BOEHRINGER) en distintas concentraciones conocidas (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 0.6, 1 y 2 unidades/ml), para construir una curva control de U/ml de IL-2 vs. cuentas por minuto incorporadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para detectar diferencias significativas en viabilidad, proliferación y secreción de IL-2 entre los cultivos tratados y el control sin tratamiento los datos fueron analizados mediante una U de Mann-Whitney de dos colas (viabilidad) o una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y un test de Bonferroni (proliferación y secreción de IL-2).

RESULTADOS

Debido a las diferencias encontradas en cada uno de los parámetros para cada grupo de cultivos experimentales, aún en los del mismo individuo, cada grupo de cultivos hechos de cada donación se analiza separadamente. En la discusión se explican las probables causas de las diferencias intraindividuales observadas.

VIABILIDAD

Después de determinar la viabilidad de los cultivos de linfocitos tratados con arsenito de sodio en la fase G0 y estimulados con PHA durante 24 horas, mediante el ensayo de MTT, se encontraron diferencias en la D.O. de los cultivos controles de algunos individuos (Tabla 1). Para eliminar este efecto y poder analizar todo el conjunto de donaciones los resultados se transformaron en porcentajes respecto a su testigo (Tabla 2). Estos resultados muestran que en la mayoría de los donadores (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y 10) el tratamiento de arsenito de sodio en las concentraciones 0.01 y 0.05 μM produjeron una reducción significativa no mayor al 10% en dos de los cultivos, mientras que los tratamientos con 0.1, 0.5 y 1 μM redujeron significativamente menos del 15% la viabilidad de once de los cultivos. Solamente en el donador número 6 el arsenito de sodio provocó decremento significativo en la viabilidad cercano al 60 % en todas las concentraciones empleadas de tratamiento. Estos resultados indican que el arsenito de sodio en las concentraciones empleadas no fue citotóxico para la mayoría de los donadores.

PROLIFERACIÓN

El ensayo de incorporación de [³H]-timidina empleado para evaluar la proliferación de cultivos de linfocitos tratados con arsenito de sodio en la fase G0 y estimulados con PHA durante 24 horas, detectó diferentes respuestas individuales a la PHA (de 180 a 5600 cpm), las cuales fueron reproducibles en las tres repeticiones hechas para cada individuo (Tabla 3). Para eliminar este efecto y poder analizar todo el conjunto de donaciones los resultados se transformaron en porcentajes respecto a su testigo, tomando en cuenta los resultados de viabilidad (Gráfica 1). Estos datos muestran que los cultivos de la mayoría de los donadores tratados con las dos concentraciones más elevadas de arsenito de sodio (0.5 y 1 µM), redujeron su capacidad proliferativa de 30% hasta 75% aproximadamente, mientras que en las concentraciones 0.01, 0.05 y 0.1 µM no se observó un patrón común para la mayoría de los donadores, ya que en los donadores 1, 2, 3, 5 y 9 la capacidad proliferativa de los linfocitos no tuvo alteraciones, y los cultivos de los donadores 4, 6, 7, 8 y 10 la capacidad proliferativa se redujo, aumentó o no tuvo cambio alguno.

En la gráfica 2 se presenta la dispersión de datos y la curva de regresión exponencial con correlación -0.66 obtenida entre la concentración de arsenito de sodio empleada como tratamiento y el porcentaje de proliferación de los cultivos. En esta gráfica podemos ver que en las concentraciones más bajas de arsénico produjeron una amplia gama de respuestas entre los individuos, y que en las concentraciones más elevadas ésta dispersión fue menor.

SECRECIÓN DE IL-2

El bioensayo empleado para determinar la cantidad de IL-2 en el sobrenadante de cultivos de linfocitos tratados con arsenito de sodio en la fase G0

y estimulados con PHA durante 24 horas, mostró diferencias en el número de U/ml de IL-2 secretada al medio (Tabla 4). Estos resultados se obtuvieron extrapolando en la curva control (Gráfica 3) los tres datos de incorporación de [³H]- timidina de los cultivos de CTLL-2, y promediándolos. Para eliminar el efecto de estas diferencias y poder analizar todo el conjunto de donaciones los resultados se transformaron en porcentajes respecto a su testigo, tomando en cuenta los resultados de viabilidad (Gráfica 4). En esta gráfica se observa que el arsenito de sodio provocó tres diferentes efectos en la capacidad de secreción de IL-2 de las células en cultivos, ya que a) para tres de los individuos (3, 7 y 9) el tratamiento no tuvo un efecto significativo; b) para seis individuos (1, 2, 4, 5, 6 y 10) hubo un decremento significativo en la capacidad de secreción de las células en al menos dos de las concentraciones de arsénico; c) para uno de los individuos (8) el tratamiento provocó un aumento significativo en una de las concentraciones empleadas.

En la gráfica 5 se presenta la dispersión de los datos y la curva de regresión potencial con correlación 0.29 obtenida entre la concentración de arsenito de sodio y el porcentaje de secreción de IL-2, lo que evidencia que el arsenito de sodio tiene efectos diferentes sobre la capacidad de las células de secretar IL-2.

TABLA 1. Determinación de la viabilidad en los cultivos de linfocitos humanos expuestos *in vitro* a arsenito de sodio por 24 h en fase G0 (DO 590 nm).

[As] μM	Don 1	Don 2	Don 3	Don 4	Don 5
0.00	0.588 \pm 0.032	0.466 \pm 0.02	0.571 \pm 0.029	0.307 \pm 0.02	0.603 \pm 0.055
0.01	0.533 \pm 0.034	0.461 \pm 0.002	0.552 \pm 0.036	0.280 \pm 0.012	0.543 \pm 0.021
0.05	0.558 \pm 0.036	no det.	no det.	0.275 \pm 0.02	no det.
0.10	0.534 \pm 0.019*	0.460 \pm 0.015	0.567 \pm 0.03	0.253 \pm 0.013*	0.556 \pm 0
0.50	0.565 \pm 0.03	no det.	no det.	0.266 \pm 0.015*	no det.
1.00	0.544 \pm 0.02	0.447 \pm 0.031	0.532 \pm 0.017	0.280 \pm 0.016	0.525 \pm 0.015

[As] μM	Don 6	Don 7	Don 8	Don 9	Don 10
0.00	0.593 \pm 0.014	0.374 \pm 0.015	0.342 \pm 0.005	0.332 \pm 0.01	0.421 \pm 0.02
0.01	0.143 \pm 0.003*	0.351 \pm 0.015	0.339 \pm 0.015	0.317 \pm 0.004*	0.422 \pm 0.001
0.05	0.121 \pm 0.001*	0.340 \pm 0.011*	0.335 \pm 0.01	0.322 \pm 0.012	0.447 \pm 0.011
0.10	0.123 \pm 0.003*	0.346 \pm 0.006*	0.330 \pm 0.002	0.338 \pm 0.011	0.421 \pm 0.01
0.50	0.140 \pm 0.02*	0.332 \pm 0.017*	0.321 \pm 0.003*	0.313 \pm 0.007*	0.387 \pm 0.016
1.00	0.171 \pm 0.04*	0.312 \pm 0.011*	0.319 \pm 0.013*	0.302 \pm 0.016*	0.386 \pm 0.007*

*= p<0.05 U de Mann-Whitney de dos colas.

TABLA 2. Determinación del porcentaje de viabilidad en los cultivos de linfocitos humanos expuestos *in vitro* a arsenito de sodio por 24 h en fase G0 (porcentaje con respecto al testigo).

[As] μM	Don 1	Don 2	Don 3	Don 4	Don 5
	100.000 \pm 5.4	100.000 \pm 4.3	100.000 \pm 5.1	100.000 \pm 6.5	100.000 \pm 10.8
0.01	91.000 \pm 5.8	99.000 \pm 4	97.000 \pm 6.3	91.000 \pm 3.9	90.000 \pm 3.5
0.05	95.000 \pm 6.1	no det.	no det.	89.000 \pm 6.5	no det.
0.10	91.000 \pm 3.2*	99.000 \pm 3.2	99.000 \pm 5.3	82.000 \pm 4.2*	92.000 \pm 0
0.50	96.000 \pm 5.1	no det.	no det.	87.000 \pm 4.9*	no det.
1.00	93.000 \pm 3.4	96.000 \pm 6.6	93.000 \pm 3	91.000 \pm 5.2	87.000 \pm 2.5

[As] μM	Don 6	Don 7	Don 8	Don 9	Don 10
0.00	100.000 \pm 3.6	100.000 \pm 3.8	100.000 \pm 1.5	100.000 \pm 3	100.000 \pm 4.7
0.01	36.000 \pm 7*	94.000 \pm 3.8	99.000 \pm 4.3	95.000 \pm 1.2*	100.000 \pm 2
0.05	31.000 \pm 2*	91.000 \pm 2.9*	98.000 \pm 2.9	97.000 \pm 3.6	106.000 \pm 2.6
0.10	31.000 \pm 8*	93.000 \pm 1.6*	96.000 \pm 6	102.000 \pm 3.3	100.000 \pm 2.4
0.50	36.000 \pm 5.1*	89.000 \pm 4.5*	94.000 \pm 9*	94.000 \pm 2.1*	92.000 \pm 3.8
1.00	44.000 \pm 10.2*	85.000 \pm 2.9*	93.000 \pm 3.8*	91.000 \pm 4.8*	92.000 \pm 1.7*

*= p<0.05 U de Mann-Whitney de dos colas.

TABLA 3. Incorporación de [³H]-timidina en los cultivos de linfocitos humanos expuestos in vitro a arsenito de sodio por 24 h en fase G0 (cpm).

[As] μ M	Don 1	Don 2	Don 3	Don 4	Don 5
0.00	171.200 \pm 15.3	1,811.000 \pm 202	572.000 \pm 87	643.300 \pm 23.6	377.000 \pm 38
0.01	167.000 \pm 22.6	1,591.000 \pm 132	678.000 \pm 9*	280.000 \pm 14*	377.000 \pm 30
0.05	151.800 \pm 11.6	no det.	no det.	789.000 \pm 84*	no det.
0.10	167.500 \pm 24.3	1,484.000 \pm 32*	672.000 \pm 123	262.000 \pm 8*	454.000 \pm 45
0.50	162.900 \pm 5.9	no det.	no det.	317.000 \pm 43.2*	no det.
1.00	99.500 \pm 6.9*	976.000 \pm 92*	271.000 \pm 21*	268.000 \pm 54.5*	238.000 \pm 25*

[As] μ M	Don 6	Don 7	Don 8	Don 9	Don 10
0.00	1,259.600 \pm 203	3,503.000 \pm 20	5,648.000 \pm 602	1,136.000 \pm 124.9	372.000 \pm 13
0.01	924.000 \pm 0*	2,103.000 \pm 41*	4,169.000 \pm 0*	1,526.000 \pm 183*	500.000 \pm 42*
0.05	533.600 \pm 0*	3,024.000 \pm 87*	4,266.000 \pm 97*	1,610.000 \pm 289*	550.000 \pm 0*
0.10	675.600 \pm 124.7*	4,081.000 \pm 15*	4,673.000 \pm 298*	1,371.000 \pm 128	330.000 \pm 31.1
0.50	703.400 \pm 13.4*	2,330.000 \pm 152*	1,526.000 \pm 0*	1,409.000 \pm 129*	238.000 \pm 26*
1.00	306.900 \pm 0*	1,174.000 \pm 17*	1,368.000 \pm 216*	373.000 \pm 0*	226.000 \pm 3.5*

*= p<0.05 U de Mann-Whitney de dos colas.

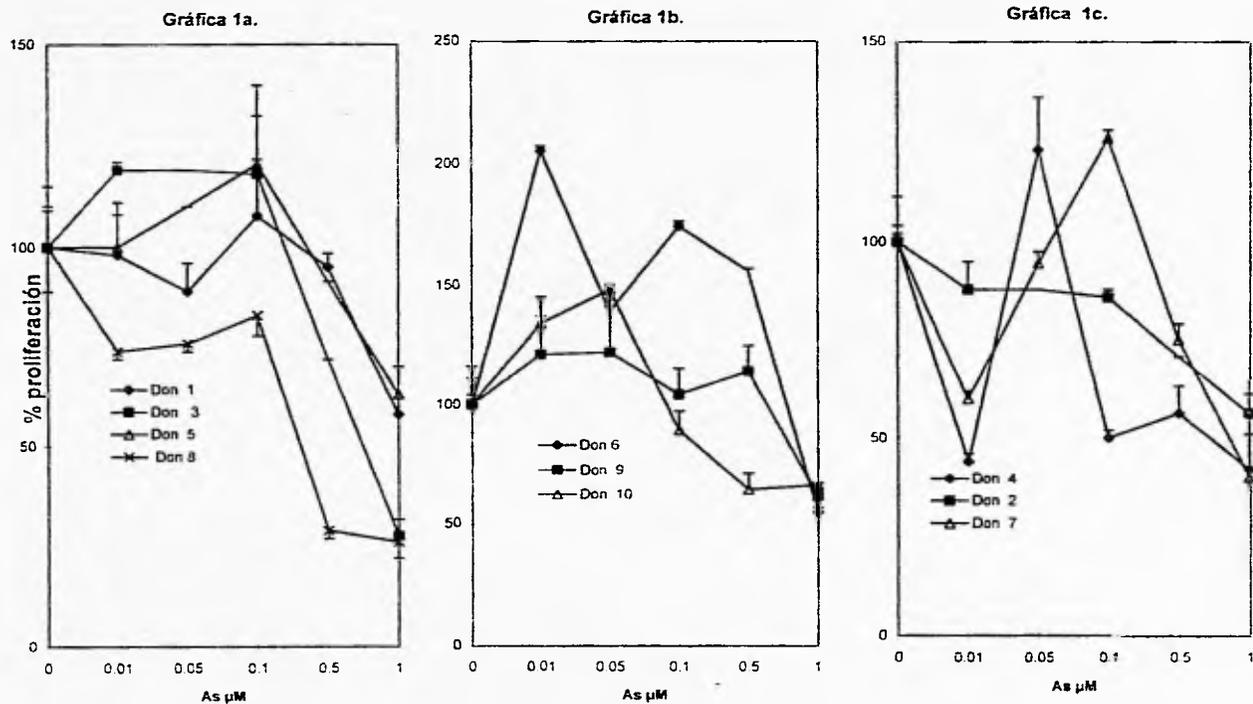
TABLA 4. Determinación de U/ml de IL-2 en los cultivos de linfocitos humanos expuestos *in vitro* a arsenito de sodio por 24 h en fase G0 (bioensayo de CTLL-2).

[As] μ M	Don 1	Don 2	Don 3	Don 4	Don 5
0.00	19.800 \pm 4.7	3.950 \pm 1.28	1.820 \pm 0.62	6.070 \pm 0.31	3.200 \pm 0.89
0.01	19.200 \pm 1.9	1.920 \pm 0.51*	2.980 \pm 0.87	3.500 \pm 0.56*	1.340 \pm 1.3
0.05	12.700 \pm 1.2*	no det.	no det.	4.060 \pm 0.60*	no det.
0.10	6.500 \pm 1.6*	1.850 \pm 0.45*	2.490 \pm 0.94	4.100 \pm 1.05*	0.870 \pm 0.26*
0.50	7.600 \pm 1.9*	no det.	no det.	5.250 \pm 0.64	no det.
1.000	12.200 \pm 2.7	1.560 \pm 0.4*	1.570 \pm 0.23	3.770 \pm 0.64*	0.540 \pm 0.13*

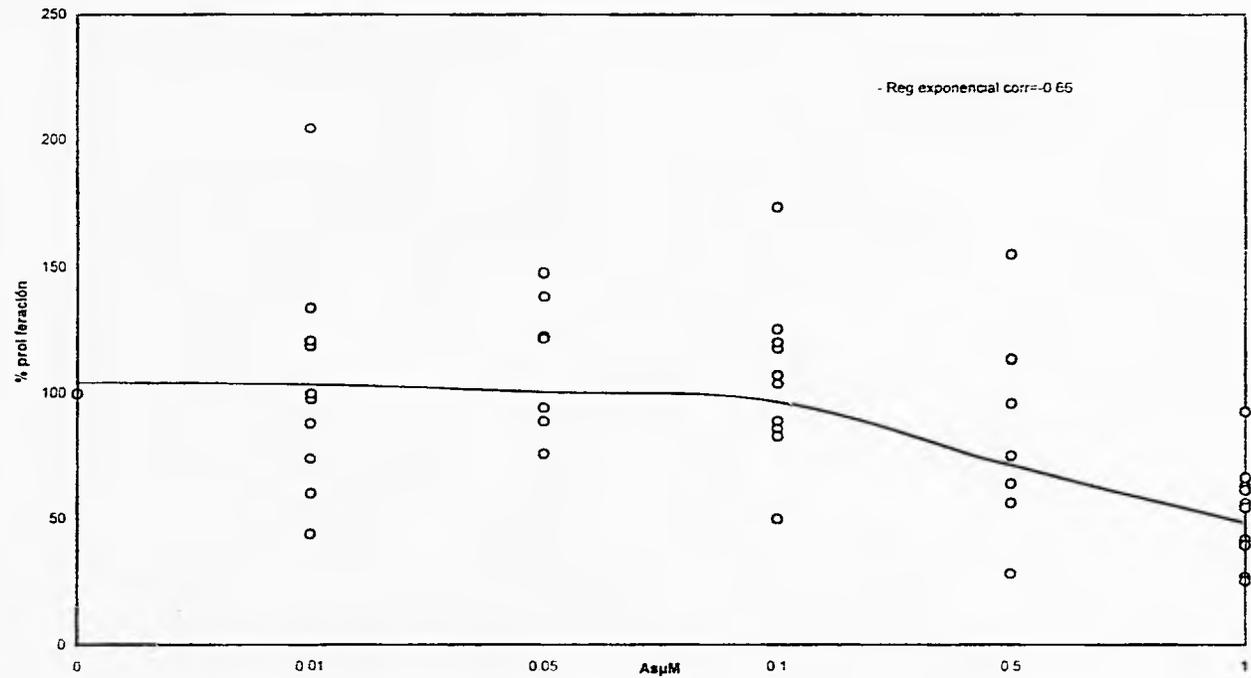
[As] μ M	Don 6	Don 7	Don 8	Don 9	Don 10
0.00	19.580 \pm 4.37	11.390 \pm 1.09	5.830 \pm 0.9	5.480 \pm 1.21	2.530 \pm 0.173
0.01	2.790 \pm 1.145*	12.970 \pm 1.68	3.980 \pm 0.21*	6.180 \pm 1.71	0.320 \pm 0.092*
0.05	0.605 \pm 0.391*	10.050 \pm 3.71	4.030 \pm 0.83*	5.740 \pm 1.82	0.300 \pm 0.071*
0.10	0.260 \pm 0.159*	11.400 \pm 1.26	5.300 \pm 0.22	5.820 \pm 0.58	1.570 \pm 0.218*
0.50	0.255 \pm 0.091*	9.610 \pm 0.43	7.520 \pm 1.2	5.250 \pm 0.73	0.800 \pm 0.086*
1.000	0.130 \pm 0.012*	12.430 \pm 0.63	9.370 \pm 1.15*	4.37 \pm 0.73	1.045 \pm 0.274*

*= $p < 0.05$ U de Mann-Whitney de dos colas.

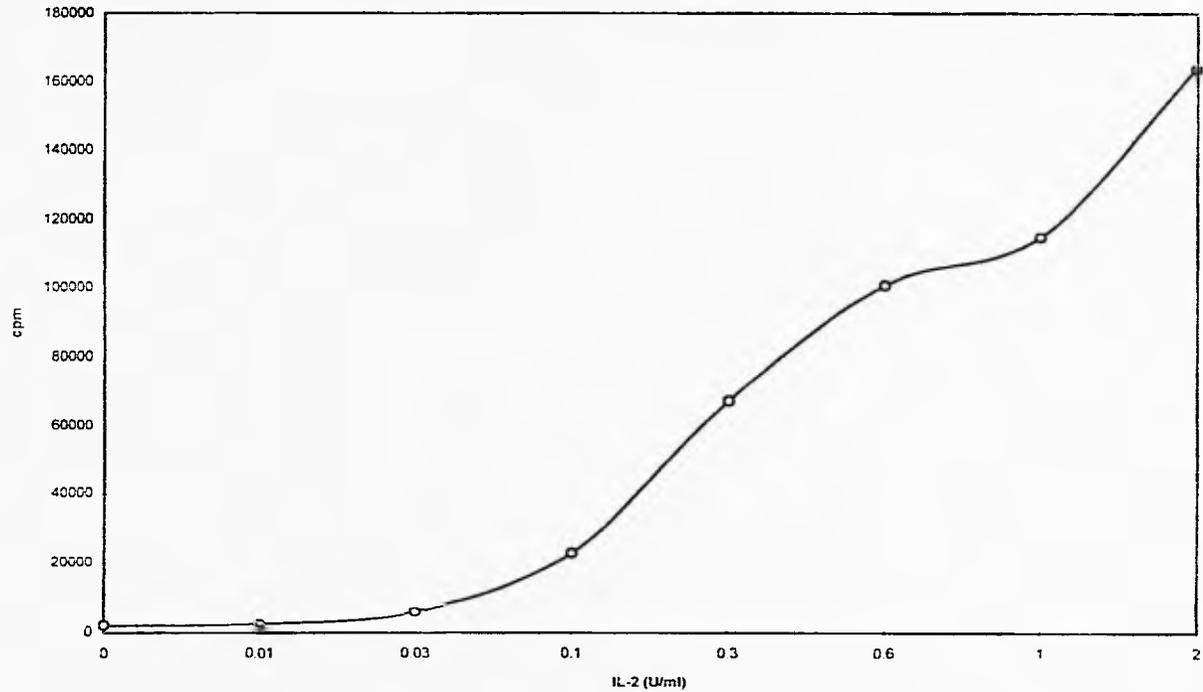
Gráfica 1. Cambios determinados en la proliferación de los cultivos de linfocitos expuestos *in vitro* a arsenito de sodio por 24 h en fase G0 (% en relación al testigo)



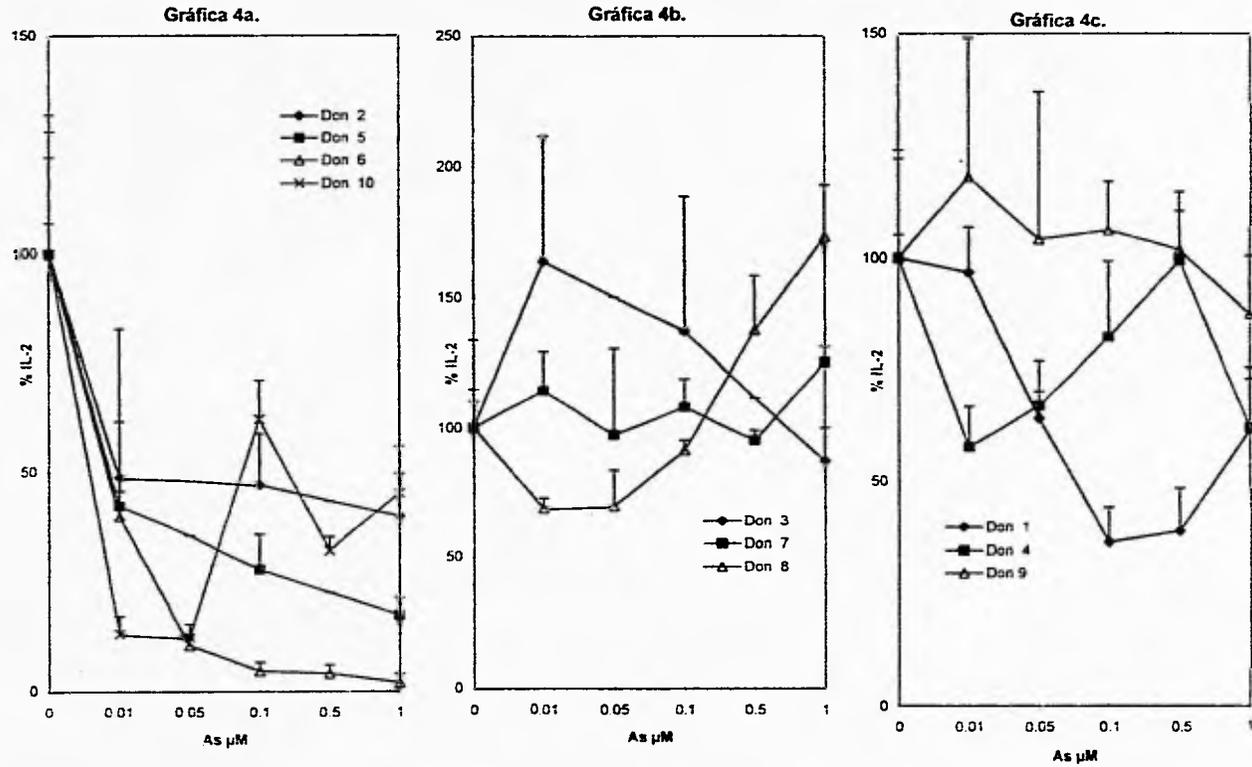
GRAFICA 2. Dispersión de datos y curva de regresión obtenida entre la concentración de arsenito de sodio y el porcentaje de proliferación.



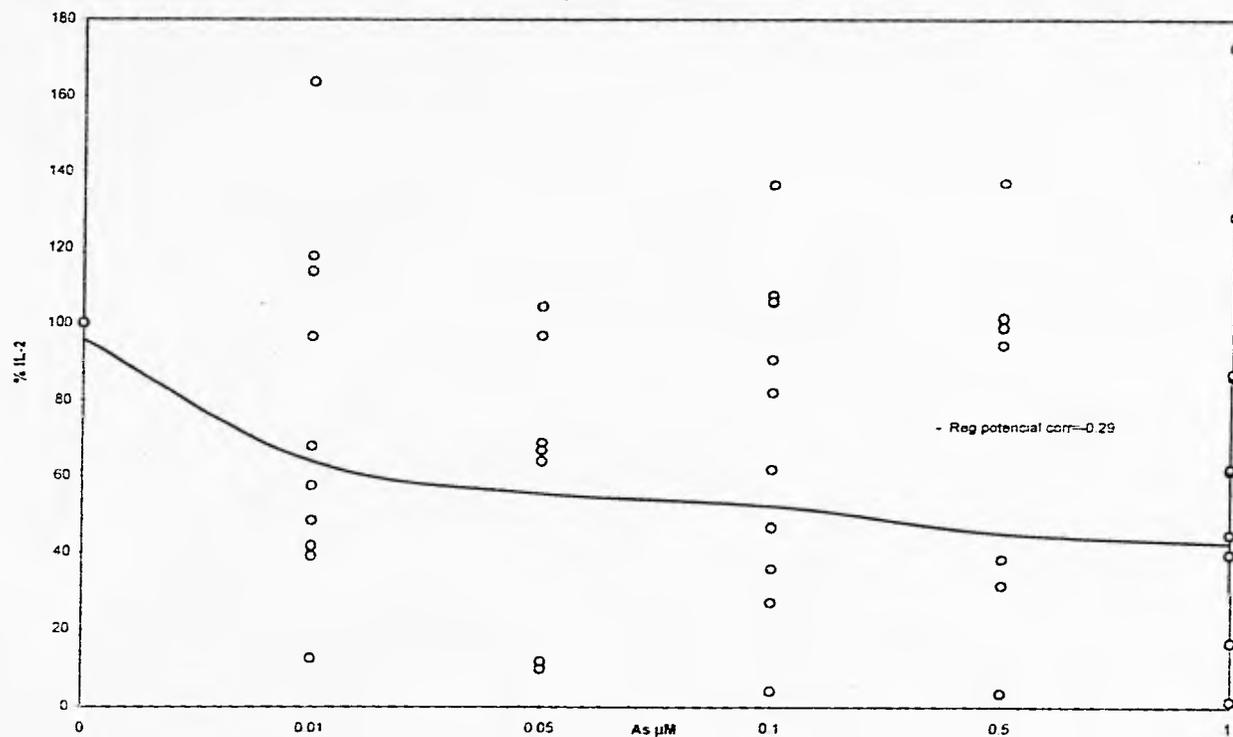
Gráfica 3. Curva control entre la incorporación de timidina tritlada y la concentración de IL-2 para los cultivos de CTLL-2



Gráfica 4. Cambios determinados en la secreción de IL-2 en los cultivos de linfocitos expuestos *in vitro* a arsenito de sodio por 24 h en fase G0 (% en relación al control)



GRAFICA 5. Dispersión de datos y curva de regresión obtenida entre la concentración de arsenito de sodio y el porcentaje de secreción de IL-2.



DISCUSIÓN

Las diferencias que se encontraron intraindividualmente para la viabilidad de los cultivos, puede explicarse en base a que el ensayo de MTT mide la capacidad metabólica de las células de reducir el MTT y producir formazán (Denizot y Lang, 1986), lo cual pudo haber ocurrido para un mismo individuo a los distintos tiempos de la extracción de sangre. En cuanto a los resultados intraindividuales diferentes observados en la capacidad proliferativa de las células, ya antes Speit y cols (1986) detectaron cambios en este parámetro en un mismo individuo en muestreos durante un cierto periodo de tiempo. Por su parte, los cambios detectados intraindividualmente en la cantidad de IL-2 secretada al medio, pueden deberse al cambio en la proporción de células CD8+/CD4+, que puede variar en función a diferentes factores ambientales (Breed et al, 1996; Bergamaschi et al, 1995), que no hayan sido controlados al tiempo de la extracción al mismo individuo. Por estas diferencias intraindividuales, las 10 donaciones se analizaron separadamente, aún si se trataba del mismo individuo.

Los resultados de viabilidad observados muestran que para nueve de diez individuos tratados el arsenito de sodio no redujo significativamente más del 20% la viabilidad de los cultivos, lo cual concuerda con lo encontrado por Lee y cols. (1989) para fibroblastos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio, en los que la dosis letal 50 fue de 2 μM . Esto quiere decir que las concentraciones de arsenito de sodio empleadas no fueron citotóxicas para la

mayoría de los individuos, por lo que las variaciones en proliferación y secreción de IL-2 en los cultivos pueden atribuirse al tratamiento con arsénico y no a un efecto citotóxico inespecífico, aunque es probable que exista una susceptibilidad individual entre los donadores para las diferentes concentraciones de arsenito de sodio empleadas. El único individuo que no presentó este patrón fue el donador 6, en el que la viabilidad de todos los cultivos tratados con arsenito de sodio se redujo más del 50%. La alta susceptibilidad individual que presentó el donador 6 en comparación a los otros donadores, puede deberse a una gran variedad de factores que se sabe están relacionados con la citotoxicidad de los compuestos; algunos de estos factores pueden ser el estado metabólico de la célula (Sopher et al, 1994), el pool genético (Lee et al, 1989), u otros factores externos a los que el individuo puede estar expuesto.

En cuanto a los resultados de proliferación obtenidos puede observarse que hubo diferencias individuales en la respuesta al tratamiento con arsenito de sodio, lo que se ve claramente reflejado en la capacidad proliferativa de los cultivos tratados con las concentraciones más pequeñas de arsenito de sodio (0.01, 0.05 y 0.1 μM), en los que se presentó una gran variedad de respuestas entre los individuos. Sin embargo para las dos concentraciones de arsénico más altas (0.5 y 1 μM), la mayoría de los individuos presentaron respuestas similares: en general el porcentaje de proliferación con respecto al control se redujo entre 35% y 75%. Tomando en cuenta estos últimos resultados y los obtenidos para viabilidad que se redujo del 4% a 15%, se sugiere fuertemente que el tratamiento con arsenito de sodio tuvo un efecto inhibitor sobre la capacidad proliferativa de las células en cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ostrosky y cols (1991), y Gonsebatt y cols (1992) que reportaban cambios en la cinética de ciclo celular y proliferación de linfocitos humanos expuestos *in vivo* a sales de arsénico, mientras que en la proliferación

de linfocitos tratados *in vitro* con arsenito de sodio Gonsebatt y cols (1994) reportaron un efecto dosis respuesta.

En cuanto a diferencias individuales como las encontradas, éstas ya han sido reportadas previamente para otros xenobióticos por diferentes autores (González y Gelboin, 1993; Elizondo et al, 1994). Estas diferencias se explican en base a la diferente capacidad de los individuos de metabolizar estas sustancias, lo que está determinado principalmente por características intrínsecas del genoma que determinan la capacidad enzimática de detoxificación. Otra explicación posible de este efecto se basa en la cantidad de proteínas presentes en el suero de los individuos, lo que puede cambiar la concentración de arsénico disponible con el que las células pueden interaccionar directamente (Teager et al, 1996), ya que está bien establecido que el arsénico tiene afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Aposhian 1989). Estas diferencias individuales también pueden deberse a factores fisiológicos que se ha visto pueden afectar la capacidad del SI de responder a señales mitogénicas, tales como la edad (Negoro et al, 1989; Kavelaars et al, 1995), la cantidad de hormonas en sangre circulante (Kawahara et al, 1990; Kavelaars et al, 1995), el estrés al que el individuo esté sometido (Glaser et al, 1990; Peterson et al, 1987), los hábitos alimenticios (Kelley y Bendich, 1996; Razani-Boroujerdi et al, 1994), etc.; además se debe tomar en cuenta que no todos los individuos responden de la misma manera ni en el mismo tiempo a la estimulación con PHA (Brill et al, 1987).

Al hacer una correlación entre los datos de porcentaje de proliferación de los cultivos de todos los individuos y la concentración μM de arsenito de sodio se obtiene una curva de correlación -0.66, que indica una tendencia en la mayoría de los individuos hacia la reducción de la capacidad proliferativa de los

cultivos con los tratamientos más altos de arsenito de sodio, tal como ya ha sido reportado por varios autores (Vega et al. 1995; Gonsebatt et al, 1994). Las concentraciones más bajas de arsenito de sodio provocaron tanto disminuciones como incrementos en la capacidad proliferativa de los cultivos de algunos individuos. Reportes sobre el efecto estimulador de otros metales en células de mamífero, que también han sido determinados como citotóxicos, han sido encontrados por Warner y Lawrence (1986) y por Fujiwara y cols. (1995).

Los datos del bioensayo para medir IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos detectaron una gran susceptibilidad individual tanto en el efecto del arsenito de sodio sobre la capacidad de secretar IL-2 de los linfocitos estimulados con PHA (gráfica 4) como en la cantidad de IL-2 secretada por las células (Tabla 4). Estos datos muestran que el arsenito de sodio puede provocar tres diferentes respuestas en las células de los individuos dependiendo de la concentración: 1) un decremento, 2) un aumento (en el menor de los casos) o bien, 3) no tener efecto alguno en la cantidad de IL-2 libre en el sobrenadante. La reducción en la cantidad de IL-2 puede deberse al retraso del ciclo celular que Gonsebatt y cols (1994) ya han reportado anteriormente en linfocitos humanos tratados con arsénico, y que puede deberse a la coacción de diferentes factores, sobre todo si se toma en cuenta la capacidad bien conocida del arsénico de interactuar con los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Aposhian, 1989). Algunos de estos factores podrían ser la desnaturalización de complejos proteicos encargados de la activación del linfocito (complejo TCR-CD3, etc.), de las proteínas encargadas de la transducción de señal en el interior celular (ZAP, tirosina cinasa, etc.), de los factores de transcripción (AP-1, NF-AT, etc.), y/o de las proteínas encargadas de transportar (incluyendo a las que forman el citoesqueleto) los péptidos sintetizados. Otro motivo por el cual el bioensayo estuviera detectando una cantidad menor de IL-2 en el sobrenadante de los

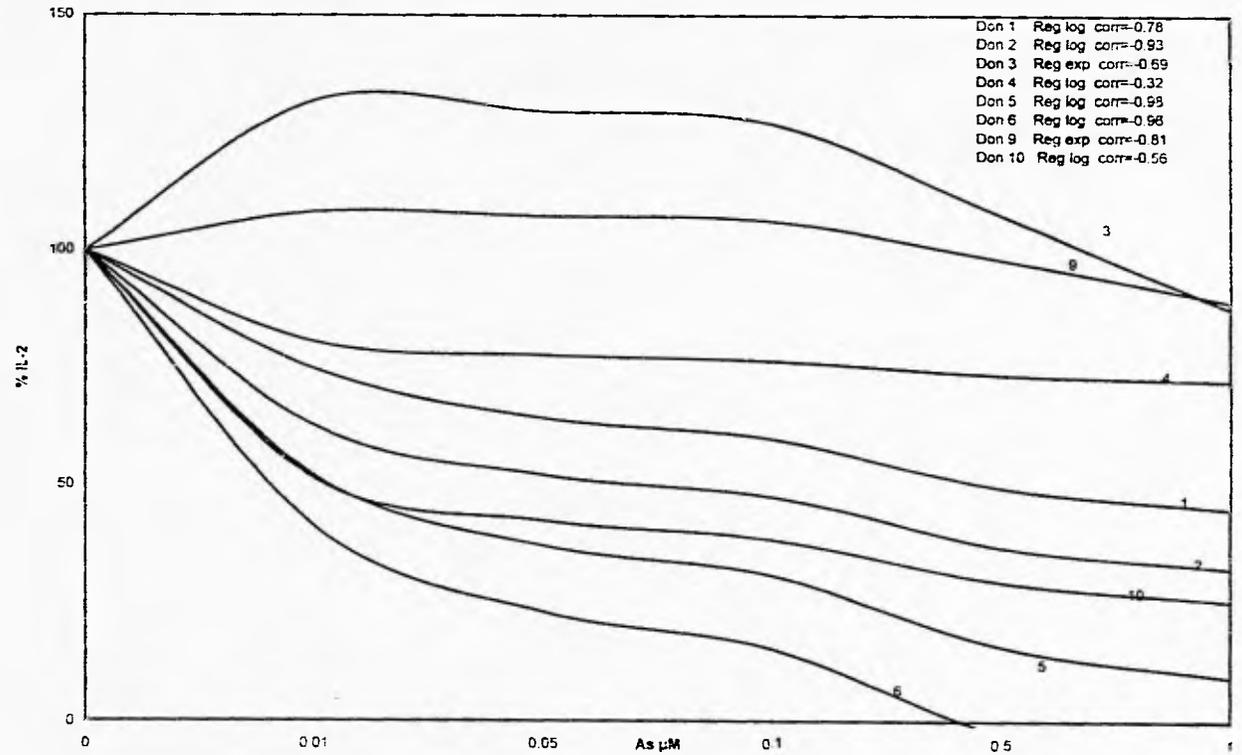
cultivos es que el arsénico interaccione con el puente disulfuro Cys-Cys de esta citocina y que es tan importante para su funcionalidad (Ciardelli et al, 1987). En cuanto al aumento detectado mediante el bioensayo para algunos de los cultivos, éste puede deberse a la interferencia del arsénico con los mecanismos de síntesis del receptor para IL-2, que ya ha sido reportado para el arsenuro de galio por Burns y Munson en 1993, y que al reducir el número de receptores de alta afinidad en la membrana celular, la cantidad de IL-2 libre en el sobrenadante puede verse aumentada, tomando en cuenta que la internalización del complejo IL-2/IL-2R es necesaria para la expansión clonal de células dependientes de IL-2 (Kumar et al, 1987). Este aumento puede deberse también a la interferencia del arsénico con algún mecanismo de la fase G1 del ciclo celular que esté relacionado con la capacidad proliferativa de los linfocitos que actúe posteriormente al encendido de genes producto de la activación, evitando así el consumo de la IL-2 previamente secretada. Otra posible causa de este efecto es la interacción del arsénico que pueda llevar a un aumento en actividad de los mecanismos de síntesis de proteínas (Lee et al, 1988; Albores et al, 1995; Chin et al, 1990).

Es importante señalar que al hacer una gráfica de dispersión y la curva de regresión entre la concentración de arsenito de sodio y la cantidad de IL-2 en el sobrenadante (gráfica 5) se obtiene una baja correlación (-0.29), resultado de la susceptibilidad individual, pero cuando se hacen regresiones por donador con estos mismos parámetros (gráfica 6) se observan curvas con altos índices de correlación, con tres tendencias diferentes: en 2 individuos hay una tendencia al aumento de la cantidad de IL-2, en 3 individuos el efecto es muy ligero o casi nulo, y en los 5 restantes hay un decremento. Las diferencias que se observaron entre individuos pueden explicarse en base a la diferente capacidad

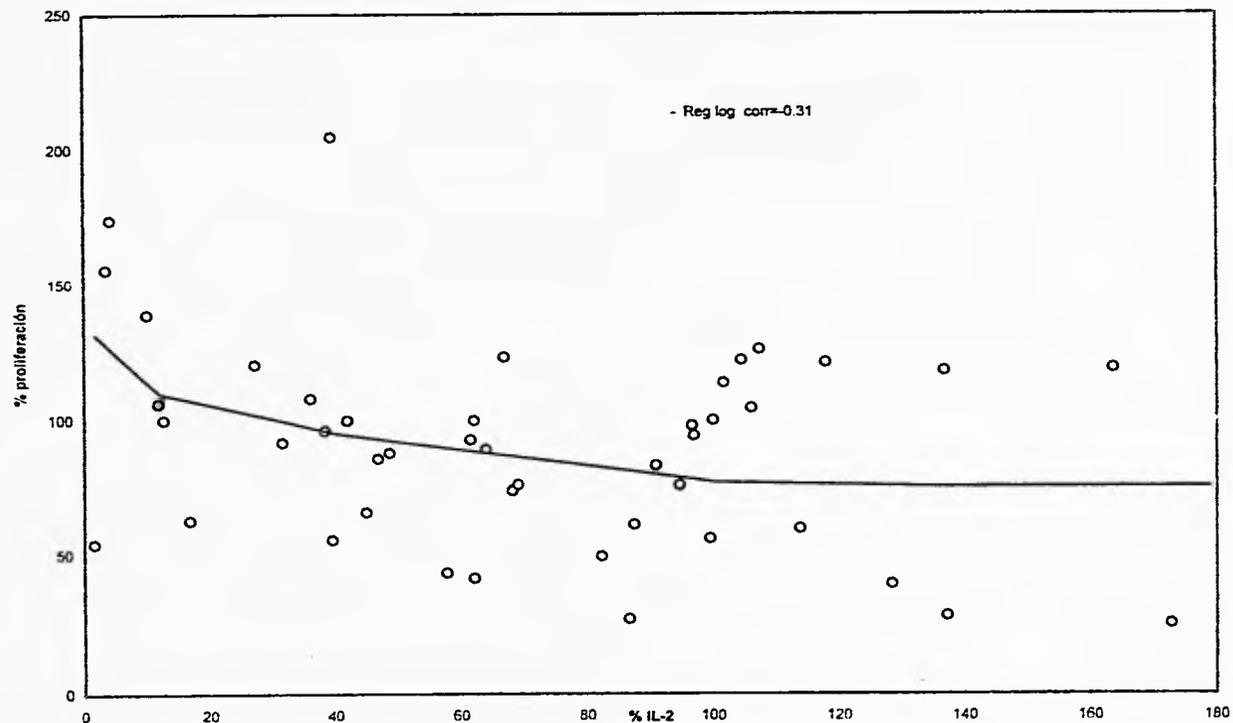
de las células para metabolizar las sales de arsénico, efecto que ya ha sido reportado por Vega y cols (1995).

Dada la importancia que la IL-2 tiene en la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular en los linfocitos T (Klaus y Hawrylowicz, 1984; Swain, 1991) debería pensarse que existe algún tipo de relación entre la cantidad de IL-2 secretada y la capacidad proliferativa de los cultivos, lo cual no resulta evidente al correlacionar ambos parámetros (gráfica 7), ni aún cuando las curvas de regresión se hacen individualmente (para todas las curvas la correlación no es mayor a 0.4). Esto puede deberse a que para cada individuo la capacidad de sus linfocitos tanto de secretar como de consumir IL-2 puede estar siendo afectada en distintas proporciones por el tratamiento de arsenito de sodio. dadas las diferencias intrínsecas del genoma de cada individuo que determinan estos dos factores. Por esta falta de correlación se puede suponer que el arsenito de sodio interfiere en los mecanismos tanto de proliferación (determinado como síntesis de ADN) como de activación de las células linfocitarias (determinado como la secreción de IL-2), alterando así la proliferación celular y la capacidad de secreción de IL-2 en los linfocitos activados.

GRAFICA 6. Curvas de regresión individuales de concentración de arsenito de sodio y porcentaje de IL-2.



GRAFICA 7. Dispersión de datos y curva de regresión obtenida entre el porcentaje de IL-2 y el porcentaje de proliferación.



BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S. (1991) Cellular and Molecular Immunology. W. S. Saunders Co. Eds. Philadelphia, USA pp.417.

Albores, A., Sinal, C., Cherian, M. y Bend, J. (1995) Selective increase of rat lung cytochrome P450 1A1 dependent monooxygenase activity after acute sodium arsenite administration *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73, 153-158.

Aposhian H. V. (1989) Biochemical Toxicology of Arsenic. *Rev. Biochem. Tox.* 10, 265- 299.

Bates, M. N., Smith, A. H. y Hopenhayn-Rich, C. (1992) Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am. J. Epidemiol.* 135, 462-476.

Bencko, V. (1987) Arsenic. En: Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Occurrence and Exposure, Fishbein, L., Furst, A., y Mehlman, M. A. (Eds.) Princeton Scientific Publishing Co., Princeton, New Jersey, USA pp 1-30.

Bergamaschi, E., Smargiassi, A., Mutti, A., Franchini, I. y Luccini, R. (1995) Immunological changes among workers occupationally exposed to styrene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67, 165-171.

Börzónyi, M., Bereczi, A., Rudnai, P., Csanady, M. y Horvath, A. (1992) Epidemiological studies on human subjects exposed to arsenic in drinking water in Southeast Hungary. *Arch. Toxicol.* 66, 77-78.

Branhuber, B., Boone, T., Kenney, W. y McKay, D. (1987) Three-dimensional structure of interleukin 2. *Science* 238, 1707-1709.

Breed, D., Porresten, V. y Vermeulen, A. (1996) Immunity to eimeria tenella in chickens: phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets. *Avian Dis.* 40, 37-48.

Brill, S., Kukvalansky, T., Tal, E., Abel, L., Polgin, Y., Dassa, C. y Globerson, A. (1987) Individual changes in T lymphocytes parameters of old human subjects. *Mech. Ageing Rev.* 40, 71-79.

Burns, L. A. y Munson, A. E. (1993) Gallium Arsenide Selectively Inhibits T Cell Proliferation and Alters Expression of CD25 (IL-2/p55). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 178-265.

Cheng, C-J y Wang, C-J. (1990) Ecological correlation between Arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res.* 50, 5470-5474.

Chin, K., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I. y Gottesman, M. (1990) Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 221-226.

Ciardelli, T. Landgraf, B., Gadski, R., Strand, J., Cohen, F. y Smith, K (1987) A semisynthetic protein engineering approach to the structural analysis of Interleukin-2. *J. Molec. Recogt.* 1, 42-47

Clark, E. A. y Ledbetter, A. (1994) How B and T cells talk to each other. *Nature*, 367, 425-428.

Crabtree, G. R. (1989) Contingent Genetic Regulatory Events in T Lymphocyte Activation. *Science*, 243, 355-361

Curnoyer, D. y Caskey, C. (1993) Gene therapy of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 297-329.

Denizot, F. y Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271-277.

Devens, B. H., Koontz, A. W., Kapp, J. A., Pierce, C. W. y Webb, D. R. (1991) Involvement of two distinct regulatory T cell populations in the antigen-specific suppression of cytolytic T cell generation. *J Immunol.* 146, 1394-1401.

Díaz Barriga, F., Santos, M.A., Yañez, L., Cuéllar, J.A., Ostrosky-Wegman, P., Montero, R., Perez, A., Ruiz, E., García, A. y Gómez, H. (1993) Biological monitoring of workers at a recently opened hazardous waste disposal site. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 3, 1-9.

Duprez, V., Cornet, V. y Dautry-Varsat, A. (1988) Down regulation of high affinity interleukin 2 receptors in human tumor T cell line. *J. Biol. Chem.* 263, 12860-12865.

Elizondo, G., Montero, R., Herrera, J., Hong, E. y Ostrosky-Wegman, P. (1994) Lymphocyte proliferation kinetics and sister chromatid-exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mutation Res.* 305, 133-137.

Fearon, E., Pardoll, D., Itaya, T., Golubeck, P., Levitsky, H., Simons, J., Karasuyama, H., Vogelstein, B. y Frost, B. (1990) Interleukin 2 Production by Tumor Cells Bypasses T Helper Function in the Generation of an Anti-tumor Response. *Cell* 60, 397-403.

Curnoyer, D. y Caskey, C. (1993) Gene therapy of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 297-329.

Denizot, F. y Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271-277.

Devens, B. H., Koontz, A. W., Kapp, J. A., Pierce, C. W. y Webb, D. R. (1991) Involvement of two distinct regulatory T cell populations in the antigen-specific suppression of cytolytic T cell generation. *J Immunol.* 146, 1394-1401.

Díaz Barriga, F., Santos, M.A., Yañez, L., Cuéllar, J.A., Ostrosky-Wegman, P., Montero, R., Perez, A., Ruiz, E., García, A. y Gómez, H. (1993) Biological monitoring of workers at a recently opened hazardous waste disposal site. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 3, 1-9.

Duprez, V., Cornet, V. y Dautry-Varsat, A. (1988) Down regulation of high affinity interleukin 2 receptors in human tumor T cell line. *J. Biol. Chem.* 263, 12860-12865.

Elizondo, G., Montero, R., Herrera, J., Hong, E. y Ostrosky-Wegman, P. (1994) Lymphocyte proliferation kinetics and sister chromatid-exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mutation Res.* 305, 133-137.

Fearon, E., Pardoll, D., Itaya, T., Golumbeck, P., Levitsky, H., Simons, J., Karasuyama, H., Vogelstein, B. y Frost, B. (1990) Interleukin 2 Production by Tumor Cells Bypasses T Helper Function in the Generation of an Anti-tumor Response. *Cell* 60, 397-403.

Fujiwara, Y., Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M. Kozuka, H. (1995) Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultures vascular smooth muscle cells. *Toxicology* 98, 105-110.

Gainer, J. y Pry, T., (1972) Effects of arsenicals on viral infections in mice. *Am. J. Vet. Res.* 33. 2299-2305.

Glaser, R., Kennedy, S., Lafuse, W.P., Bonneau, R.H., Speicher, C., Hillhouse, J. y Kiecolt-Glaser, J.K. (1990) Psychological stress-induced modulation of interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 production in peripheral blood leukocytes. *Arch. Gen. Psychiatry.* 47, 707-12.

Goldsmith, M. A., Lai, S. Y., Xu, W., Amaral, M. C., Kuczek, E. S., Parent, L. J., Mills, G. B., Tarr, K. L., Longmore, G. D. y Greene, W. C. (1995) Growth Signal Transduction by the Human Interleukin-2 Receptor Requires Cytoplasmic Tyrosines of the β Chain and Non- tyrosine Residues of the γ c Chain. *J. Biol. Chem.* 270, 21729-21737.

Gonsebatt, M., Vega, L., Herrera, L., Montero, R., Rojas, E., Cebrián, M. y Ostrosky-Wegman, P. (1992) Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutation Res.* 283, 91-95.

Gonsebatt, M., Vega, L., Montero, R., Garcia Vargas, G., Del Razo, L. M., Albores, A., Cebrián, M. E. y Ostrosky-Wegman, P. (1994) Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutation Res.* 313, 293-299.

Gonzalez, F. y Gelboi, H. (1993) Role of human cytochrome P450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J. Toxicol. Environ. Health* 40, 289-308.

Goyer, R.A. (1991) Toxic effects of metals. En: Cassaret and Doull's Toxicology. Amdur, M. O., Doull, J. y Klaassen, C. D. (Eds.) Pegamon Press, New York , pp 623-680.

Howard, O. M. Z., Kirken, R. A., Garcia. G. G., Hackett, R. H. y Farrar, W. L. (1995) Structural domains of interleukin-2 receptor β critical for signal transduction: kinase association and nuclear complex-formation. *Biochem. J.* 306, 217-224.

IARC (1987) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metal and metallic compounds, Vol 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon France.

Izquierdo Pastor, M., Reif, K. y Cantrell, D. (1995) The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. *Immunol. Today* 16, 159-164.

Kavelaars, A., Zijlstra, J., Bakker, J. M., Van Rees, E. P., Visser, G. H., Zegers. B. J. y Heijnen, C. J. (1995) Increased dexamethasone sensitivity of neonatal leukocytes: different mechanisms of glucocorticoid inhibition of T cell proliferation in adult and neonatal cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 1346- 1351

Kawahara, R. S., Deng, Z-W. y Deuel, T. F. (1990) Glucocorticoids Inhibit the Transcriptional Induction of *JE*, a Platelet-derived Growth Factor-inducible Gene. *J. Biol. Chem.* 266, 13261-13266.

Kelley, D.S. y Bendich, A. (1996) Essential nutrients and immunological functions. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 994S-996S.

Klaus, G. G. B. y Hawrylowicz, C. M. (1984) Cell-cycle control in lymphocyte stimulation. *Immunol. Today* 5, 15-19.

Kono, T., Minami, Y y Taniguchi, T. (1993) The interleukin-2 receptor complex and signal transduction: role of the β -chain. *Sem. Immunol.* 5, 299-307.

Kripke, M. (1994) Ultraviolet radiation and immunology: something new under the sun--presidential adress *Cancer Res.* 54, 6102-6105.

Kumar, A., Moreau, J. L., Gibert, M. y Thèze, J. (1987) Internalization of Interleukin 2 (IL-2) by High Affinity IL-2 Receptors is Required for thr Growth of IL-2-dependent T Cell Lines. *J. Immunol.* 139, 3680-3684.

Lee T., Tanaka, N., Lamb, P. W., Gilmer, T. M. y Barret, J. C. (1988) Induction of Gene Amplification by Arsenic. *Science* 241, 79-81.

Lee, T-C., Ko, J-L. y Jan, K. (1989) Diferential citotoxicity of sodium arsenite in human fibroblasts and chinese hamster ovary cells. *Toxicology* 56, 289-299.

Minami, Y., Kono, T., Miyasaki, T. y Taniguchi, T. (1993) The IL-2 Receptor Complex: Its Structure, Function, and Target Genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 245-267.

Mosmann, T., Cherwinski, H., Bond, M., Giedlin, m. y Coffman, R. (1986) Two Types of Murine Helper Cell Clones. I. Definition According to Profiles of Lymphokines Activities and Secreted Proteins. *J. Immunol* 136, 2348-2357.

Negoro, S., Hara, H., Deguchi, Y., Nishio, S., Jia, L., Wang, J. y Kishimoto, S. (1989) The characteristic changes of immune function with aging. *Kekkaku* 64, 657-667.

Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., , Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., García-Vargas, G., del Razo, L. M. y Cebrián,

M. (1991) Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Res.* 250, 477-482.

Pardoll, D. (1993) New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors *Curr. Opinion Immunol.* 5, 719-725.

Peterson, P.K., Sharp, B., Gekker, G., Brummitt, C. y Keane, W.F. (1987) Opioid-mediated suppression of interferon-gamma production by cultured peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Invest.* 80, 824-31.

Razani-Boroujerdi, S., Savage, S.M. y Sopori, M.L. (1994) Alcohol-induced changes in the immune response: immunological effects of chronic ethanol intake are genetically regulated. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 37-43.

Robey, E. y Allison J. P. (1995) T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol. Today* 16, 306-309.

Roitt, I., Brostoff, J., y Male, D. (1996) Immunology. Ed. Mosby. Barcelona, España. pp. 420.

Scell, S. y Fitch F. (1989) Pretreatment of Cloned Helper T Lymphocytes with IL-2 Induced Unresponsiveness to Antigen and Concanavalin A, Associated with Decreased Inositol Phosphate and Diacylglycerol Production. *J. Immunol.* 143, 1499-1505.

Shevach, E. (1985) The effects of cyclosporin A on the immune system *Ann. Rev. Immunol.* 3, 397-423.

Shoental, R. (1995) Trichothecenes, zeralenone, and other carcinogenic metabolites of *Fusarium* and related microfungi *Adv. Can. Res.* 45, 217-290.

Smith, K. A. (1988) Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. *Science* 240, 1169- 1176.

Smith, K. A. (1989) The Interleukin 2 Receptor. *Anu. Rev. Cel. Biol.* 5, 397- 425.

Sopher B. L., Fukuchi, K., Smith, A. C., Leppig, K. A., Furlong, C. E. y Martin, G. M. (1994) Cytotoxicity mediated by conditional expression of a carboxyl-terminal derivative of the beta amyloid precursor protein. *Brain Res. Mol. Brain Rs.* 26, 207-217.

Speit, G., Düring, R. y Mehnert, K. (1986) Variation in the frequency of sister chromatid exchanges in repeated human lymphocyte cultures. *Hum. Genet.* 72, 179-181.

Stern, J. B. y Smith, K. A. (1986) Interleukin-2 Induction of T-Cell G1 Progression and c-myc Expression. *Science* 233, 203-233.

Swain, S. L. (1991) Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 304- 310.

Taeger, K., Shulze, K., Weninger, E., Rodig, G. y Peter, K. (1986) Thiopental distribution in the blood of surgical patients. *Anasth. Intensivther Notfallmed.* 21,175-180.

Vahter, M. (1988) Arsenic. En: Clarkson, T. W., Fiberg, L., Nordberg, G. F. y Sager, P. R. (Eds.) *Biological Monitoring of Toxic Metals*, Plenum Press, New York.

Vega, L., Gonsebatt, M. y Ostrosky-Wegman, P. (1995) Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected *Mutation Res.* 334, 365-373.

Warner, G. L. y Lawrence, D. A. (1986) Cell surface and cell cycle analysis of metal-induced murine T cell proliferation. *Eur. J. Immunol* 16, 1337-1342.

Weiberg, K. y Parkman, R. (1990) Severe immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. *New. Eng. J Med.* 322, 1718-1723.

WHO (1981) Arsenic. Environmental Health Criteria 18, World Health Organization, Ginebra.

ESTA TESIS NO TIENE
SALIDA DE LA BIBLIOTECA