

03081

19  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado  
del Colegio de Ciencias y Humanidades

## EFFECTOS INMUNOTOXICOLOGICOS DEL ARSENICO

T E S I S  
Que para obtener el grado de  
Doctora en Investigación Biomédica Básica  
p r e s e n t a  
MIBB. LIBIA VEGA LOYO

México, D. F.

1998

258520

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Esta tesis fue dirigida por los doctores Patricia Ostrosky-Wegman y Rafael Saavedra Durán, y fue realizada en los departamentos de Genética Toxicológica y de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

*A mi padre, por ser una excelente guía en mi vida.  
A Guillermo, por ser uno de los pilares más fuertes que me sustentan.  
A mis hermanas, todas ellas, por darme fuerza para querer ser un buen ejemplo.  
A la memoria de mi madre, quien yo sé que se sentiría orgullosa.*

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutorial por la dirección y los aportes a este trabajo;  
Dra. Patricia Ostrosky-Wegman  
Dr. Rafael Saavedra Durán  
Dr. Enrique Ortega Soto

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y sugerencias sobre este trabajo, que finalmente le dieron forma  
Dr. Fabio Salamanca Gómez  
Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi Velázquez  
Dra. Patricia Ostrosky-Wegman  
Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete  
Dr. Enrique Ortega Soto  
Dr. Leopoldo Santos Argumedo  
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama.

A las personas que colaboraron para lograr este trabajo; Vicente Madrid, Antonio, Rafael Saavedra, Pável Montes de Oca, Ignacio Terrazas, Luis Serrano, Cinthya Díaz, Teresa Fortoul, Monserrat Sordo, Ana María Salazar y Miriam Rodríguez.

A mis compañeros de laboratorio y amigos por el apoyo que siempre tuve; Emilio, Luis, Daniel, Carlos, Iván, Monserrat, Georgina, Karla, Silvia, Tzuytzuy, Mahara, Adriana, Ana, Lorena, Maricarmen, Laura y Rocío.

CONTENIDO	Página
Resumen	2
Abstract	3
Lista de abreviaturas	4
<b>CAPÍTULO I</b>	
Introducción	5
Clasificación de los marcadores biológicos	5
El sistema Inmune	8
Efecto de los xenobióticos sobre el sistema inmune	15
Inmunotoxicidad de los metales	17
El Arsénico	18
<b>CAPÍTULO II</b>	
Planteamiento del estudio	21
Hipótesis	21
Objetivos generales	21
Estrategia experimental	22
<b>CAPÍTULO III</b>	
Artículo I	
The Immunosuppressant Effect of Sodium Arsenite on Human Lymphocytes <i>in vitro</i> . I. Alteration on Interleukin-2	23
Artículo II	
The Immunosuppressant Effect of Sodium Arsenite on Human Lymphocytes <i>in vitro</i> . II. Inhibition of IL-2 protein secretion	41
<b>CAPÍTULO IV</b>	
Material y métodos	53
<b>CAPÍTULO V</b>	
Resultados	57
<b>CAPÍTULO VI</b>	
Discusión	68
Conclusiones	72
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	74

## RESUMEN

El arsénico (*As*) es un metaloide muy común que se encuentra como contaminante en el agua de bebida en varias regiones del mundo; la exposición crónica a este metaloide esta asociada a una mayor incidencia de cáncer de piel, pulmón, vejiga y riñón. Se ha encontrado una mayor susceptibilidad a infecciones virales en ratones tratados con varios compuestos arsenicales. Estudios previos sugieren que la exposición a *As* producen una disminución en la proliferación de células T estimuladas por mitógenos (PHA) en humanos.

Con la finalidad de entender el mecanismo de esta supresión, evaluamos el efecto del *As* en linfocitos de sangre periférica humana tratada *in vitro*, y en células de bazo de ratones transgénicos TG.AC tratados *in vivo*. Se evaluó la expresión del receptor a interleucina 2 (IL-2), la secreción de IL-2, la IL-2 intracelular y la expresión del gen de IL-2, al igual que el posible efecto sobre las subpoblaciones linfocitarias y la interacción antígeno-anticuerpo, también estudiamos los cambios morfológicos inducidos por el *As* en linfocitos humanos por microscopía electrónica.

Se observó una inhibición de la proliferación celular en todos los individuos estudiados, la inducción del receptor de IL-2 se mantuvo a niveles normales, mientras que la secreción de IL-2 se redujo. La adición de IL-2 humana recombinante a los cultivos de linfocitos tratados revirtió el efecto inhibitor del *As* de manera dosis-respuesta, indicando que la inhibición en la proliferación se puede deber a una concentración subóptima de IL-2 presente en el medio de cultivo, puesto que

La determinación del ARN mensajero del gen de IL-2 demostró que la inhibición no es a nivel transcripcional, sino posiblemente en el transporte intracelular y secreción de la proteína, puesto que en el análisis de microscopía electrónica se observaron alteraciones en el aparato de Golgi y desarreglos del citoesqueleto (encargado del correcto transporte de vesículas dentro de la célula), además de otras alteraciones ultraestructurales, tales como daño en mitocondrias y la membrana perinuclear.

Por otra parte, se encontró que los linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio, muestran una mayor concentración de IL-2 intracelular que los linfocitos no tratados.

No se observaron efectos del *As* sobre las subpoblaciones linfocitarias, aunque si se determinó que es capaz de interferir con la unión antígeno-anticuerpo de manera reversible. Ninguno de estos efectos fue reproducible en el modelo animal seleccionado (ratones transgénicos TG.AC). Se observaron diferencias en la susceptibilidad individual entre los donadores de este estudio.

La exposición a arsenito de sodio puede crear un estado de supresión celular determinado por la interferencia con la secreción de IL-2 *in vitro*.

## ABSTRACT

Arsenic is a common metalloid that can be found in well-water; chronic exposure to arsenic is related with the increase of skin, lung, bladder and kidney cancer incidence. An increased susceptibility to viral infections had been found in mice treated with several arsenical compounds. Previous studies suggest that arsenic exposure can reduce T cell proliferation in humans.

In order to understand this suppression mechanism we evaluated arsenic effects in human peripheral blood cells treated *in vitro*, and in mice spleen cells treated *in vivo* on CD25 expression, IL-2 secretion, intracellular IL-2 and induction of IL-2 mRNA, as well as the effect in lymphocyte subpopulations and morphological changes by electron microscopy.

An inhibition of cell proliferation was observed in all studied samples, CD25 expression was maintained at basal levels while the IL-2 secretion was reduced. Cell proliferation inhibition could be due to a suboptimal IL-2 concentration since the addition of human recombinant IL-2 to arsenic-treated lymphocyte cultures reverted, in a concentration-related fashion, the inhibitory effect of arsenic.

mRNA determination of IL-2 gene induction showed that inhibition of IL-2 was not at the transcriptional level, but at the intracellular transport and secretion level, since Golgi apparatus alterations were observed as well as cytoskeleton dearrangement (responsible of the correct transport of vesicles within the cell), besides other ultrastructural alterations in mitochondria and perinuclear membrane.

On the other hand, human sodium arsenite-treated lymphocytes, showed higher intracellular levels of IL-2 than non-treated lymphocytes.

There were no effect on the lymphocyte subpopulations, even when it was determined that arsenic can interfere with antigen-antibody binding. None of the observed effects were reproducible in the animal model selected (transgenic mice). Differences in individual susceptibility were observed among the donors tested.

Exposure to sodium arsenite can produce a cellular suppressed status determined by the interference with IL-2 secretion *in vitro*.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	FITC	Isotiocianato de fluoresceina
ARN	Ácido ribonucleico	GSF/GM	Factor estimulante del crecimiento de granulocitos y monocitos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero		
ATP	Trifosfato de adenosina	IFN	Interferón
As	Arsénico	Ig	Inmunoglobulina
CD3	Grupo de diferenciación 3, célula T	IL	Interleucina
CD4	Grupo de diferenciación 4, célula T, restricción MHC de clase II	IL-2hr	Interleucina 2 humana recombinante
CD8	Grupo de diferenciación 8, célula T, restricción MHC de clase I	IP	Fosfato de inositol
CD16	Grupo de diferenciación 16, receptor Fcγ RIII	kD	Kilodaltones
CD19	Grupo de diferenciación 19, linfocitos B	MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
CD22	Grupo de diferenciación 22, linfocitos B	MIP	Proteína inhibidora de macrófagos
CD25	Grupo de diferenciación 25, receptor de IL-2, p55	MTT	3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-bromuro de difeniltetrazolio
CD28	Grupo de diferenciación 28, receptor B7	NKC	Células asesinas naturales
CD69	Grupo de diferenciación 69, marcador de activación	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
Con A	Concanavalina A	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CPA	Célula presentadora de antígeno	PE	Ficoeritrina
CTL	Linfocito T citotóxico	PHA	Fitohemaglutinina
CTLL-2	Línea celular de linfoblastos T citotóxicos dependientes de IL-2, -4 y -15	PKC	Proteína cinasa C
DAG	Diacil glicerol	PLC	Fosfolipasa C
DE	Desviación estándar	PMN	Linfocitos polimorfonucleares
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato	PWM	Mitógeno pokeweed
dT	Desoxitimidina	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
		SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
		TCR	Receptor de célula T
		TGF	Factor de crecimiento tumoral
		Th	Linfocito T ayudador
		TNF	Factor de necrosis tumoral
		TPA	Triacetato de forbol

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Aunque la inmunología es una ciencia que comenzó al final del siglo XIX, el interés sobre los efectos de sustancias, de procedencia no biológica, sobre el sistema inmune es de reciente origen. La inmunotoxicología emergió formalmente, como una disciplina diferente, en los años 70s (*Vos, 1980; Dean et al., 1982; Luster et al., 1982; Descotes, 1988; Koller, 1990*).

El primer programa de inmunotoxicología fue establecido en 1978, dando finalmente reconocimiento a este nuevo campo, que aunque joven, ha encaminado sus esfuerzos a demostrar que algunos xenobióticos pueden modular las funciones del sistema inmune y que, en algunas ocasiones, el sistema inmune es el blanco principal de estas sustancias.

La manera de obtener datos sobre si el estado de salud de los individuos de poblaciones en las que se sospecha alguna exposición, ya sea accidental o laboral a sustancias tóxicas, se encuentra alterado, es a través de estudios epidemiológicos. Esta información puede proveer datos acerca del estado inmunológico de los individuos expuestos, aunque estos datos no son precisos la mayoría de las veces, debido a la gran variación que existe en cuanto a la susceptibilidad y la capacidad del sistema inmune de los individuos (*Dean et al., 1982*).

La exposición a xenobióticos es causa de preocupación sobre todo ante el descubrimiento de sus efectos a largo plazo. En el monitoreo biológico de individuos expuestos a factores tóxicos se ha propuesto el uso de "marcadores biológicos", que son indicadores de eventos ocurridos en el organismo o en un grupo celular particular.

El efecto de los xenobióticos sobre el sistema inmune puede producir varios tipos de respuestas o cambios perceptibles a diferentes niveles, que pueden ser utilizadas como marcadores específicos, tanto de exposición como de efecto, o incluso de susceptibilidad hacia ciertos xenobióticos. Estos mismos marcadores biológicos pueden ser utilizados para tratar de esclarecer el mecanismo por el cual estas sustancias químicas pueden relacionarse con la producción de enfermedades.

### CLASIFICACIÓN DE LOS MARCADORES BIOLÓGICOS

Si la exposición a xenobióticos produce cambios o alteraciones tempranas o iniciales en los individuos, antes del desarrollo del impedimento o la enfermedad, éstos cambios podrían convertirse en señales o "marcadores" que pueden ser evaluados mediante estrategias adecuadas, y correlacionarse con los efectos observados a largo plazo en modelos experimentales o en grupos humanos expuestos (*NRC, 1989*).

La detección de un xenobiótico en fluidos o tejidos es una señal de que el organismo tuvo, o ha estado en contacto con éste, por lo que puede constituir un marcador de exposición (*Baur et al., 1984; Pezzini et al., 1984; Kapsenberg et al., 1988*). Cuando la exposición ha causado cambios en los organismos, es posible caracterizarlos cuali- o cuantitativamente a través de

diferentes estrategias. Estas mediciones constituyen marcadores o indicadores biológicos de efecto, que son las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o de otro tipo que, dependiendo de su magnitud, pueden ser reconocidas como un daño potencial o efectivo sobre la salud (Radford, 1981). Finalmente, un marcador biológico de susceptibilidad es aquel indicador de una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder al reto de la exposición a un agente xenobiótico específico (Holt y Keast, 1977; Twomey, 1982; Warren et al., 1982; Hausman y Weksler, 1985; Reidenberg y Drayer, 1986; Chandra, 1987; Watson, 1988; Castilla et al., 1989; Stiller-Winkler et al., 1989; Hulka et al., 1990) (tabla 1).

**Exposición.** Este tipo de marcadores normalmente se limita a la detección del xenobiótico o a alguno de sus metabolitos, aunque en algunos casos, pueden encontrarse respuestas inmediatas a la exposición, tales como reacciones de hipersensibilidad o anticuerpos antígeno-específicos. La mayoría de las sustancias que desencadenan estas respuestas forman haptenos y provocan reacciones inflamatorias evidentes. La evaluación en cuanto a los biomarcadores de exposición es en general bastante clara, puesto que se han desarrollado numerosas técnicas que permiten

**Tabla 1. Clases de marcadores biológicos aplicados a la inmunotoxicología**

#### **EXPOSICIÓN**

- Xenobiótico
- Metabolito químico
- Productos de la interacción entre el químico y su célula o biomolécula blanco
- Concentración del material en orina, sangre u otros tejidos, como uñas o cabello
- Incremento en anticuerpos antígeno-específicos
- Anticuerpos contra el tóxico y formación de haptenos
- Respuesta *in vivo* al tóxico (pruebas de hipersensibilidad)

#### **EFEECTO**

- Cambios en los tejidos causados por alteraciones mediadas por anticuerpos
- Falla renal por acumulación de auto-anticuerpos
- Número total o relativo de linfocitos circulantes y cambios en las subpoblaciones
- Proliferación de linfocitos estimulados por mitógenos o antígenos específicos
- Activación de linfocitos y monocitos *in vitro* por el xenobiótico
- Determinación de la secreción de linfocinas
- Determinación de las diferentes clases de inmunoglobulinas

#### **SUSCEPTIBILIDAD**

- Detección de desórdenes inmunoproliferativos
- Respuesta quimiotáctica alterada
- Alteraciones en el número de cualquiera de las principales clases de linfocitos o en su actividad
- Reacciones autoinmunes
- Niveles de hormonas inmunosupresoras (estrógenos)
- Deficiencias en proteínas o amino ácidos
- Deficiencias en vitaminas o elementos traza

detectar cantidades muy pequeñas de ciertos elementos, tanto en tejidos como en fluidos corporales (*Casarett y Doull's, 1991*).

La exposición externa es la cantidad o concentración del xenobiótico en el ambiente al que esta expuesto un organismo, mientras que la dosis interna se refiere a la cantidad de xenobiótico que es transferida al, o absorbida por el organismo. La dosis biológicamente efectiva, en términos generales, es la dosis interna que está cuantitativamente relacionada con un efecto biológico, y está determinada por la biodisponibilidad del compuesto en el tejido blanco; sin embargo es mucho más preciso considerarla como la cantidad de material xenobiótico que ha interactuado con un receptor celular crítico, con un blanco celular o tisular en donde el efecto biológico se inicia (*Elinder et al., 1987*).

Debido a lo anterior se hace evidente la continua necesidad de desarrollar, a través de la investigación, los marcadores adecuados de exposición que reflejen de manera precisa la dosis interna del xenobiótico y poder determinar así la dosis biológicamente efectiva y la cantidad biodisponible del compuesto, puesto que la cantidad de xenobiótico que es realmente absorbida por el organismo es generalmente desconocida, y a veces puede estar dentro de los límites de detección, además de considerar que diferentes órganos o tejidos pueden, en algunas ocasiones, contener cargas biológicas muy altas de los compuestos sin sufrir ninguna alteración (tejidos de acumulación), mientras que en otros, la presencia del xenobiótico puede causar graves y profundos daños sin la necesidad de mantener una concentración elevada o constante. También es importante considerar que las fases de biodisponibilidad de un determinado compuesto pueden variar dependiendo de condiciones, tanto clínicas como nutricionales, del individuo, y en particular del tejido que se observa (*Wild, 1990*).

Otro importante marcador biológico de exposición es la carga corporal. Ella se refiere al total de la dosis interna acumulada en el organismo a lo largo del tiempo. Dependiendo de la toxicocinética del agente en cuestión, la carga corporal puede ser un marcador de las exposiciones recientes o del pasado distante. La carga corporal incluye la dosis en los sitios blanco del receptor, pero también puede incluir la cantidad de material xenobiótico acumulado en otros compartimentos no blanco. A pesar de que la carga corporal en lugares remotos puede o no ser relativamente inerte, biológicamente hablando, tiene el potencial de ser liberada en condiciones de estrés metabólico. Esta liberación puede ser una dosis efectiva altamente dañina, aún mucho después de la exposición externa original (*Casarett y Doull's, 1991*).

**Efecto.** Para determinar que ha habido un efecto en el sistema inmune causado por la exposición a un xenobiótico, debe poderse detectar alguna alteración celular o bioquímica en cualquiera de los compartimentos del sistema inmune. Estas mismas medidas deben proveer información acerca de la magnitud del efecto para poder reconocer a la exposición como un riesgo potencial o como la causa de una enfermedad específica (*Casarett y Doull's, 1991*).

Si la exposición a una sustancia tóxica y la dosis interna son lo suficientemente altas, se desarrollará una enfermedad, porque la dosis biológicamente efectiva será suficiente para afectar alguna función, ya sea de forma irreversible o por un periodo sustancial de tiempo (*IARC, 1992*). La transición a la manifestación de la enfermedad puede depender de las propiedades del

xenobiótico, la naturaleza de la exposición, el proceso de la enfermedad en sí mismo o de susceptibilidades individuales (Elinder et al., 1987).

**Susceptibilidad.** En el caso específico del sistema inmune, los marcadores de susceptibilidad generalmente están dirigidos hacia la detección de limitaciones en los organismos, tanto heredadas como adquiridas, que les impiden responder adecuadamente a los retos por xenobióticos que tengan actividad inmunogénica, o que modifiquen la respuesta inmunológica hacia otros antígenos particulares (NRC, 1992). Este tipo de marcadores puede no estar relacionado con alguna actividad específica del sistema inmune, y en la mayoría de los casos puede ser detectado en algún otro compartimento.

Algunos marcadores biológicos pueden indicar la existencia de factores individuales o poblacionales que pueden afectar la respuesta a agentes ambientales. Estos factores son independientes de la ocurrencia de la exposición, a pesar de que la exposición a veces incrementa la susceptibilidad al efecto de posteriores exposiciones. Una característica intrínseca o una enfermedad preexistente que aumente la dosis interna o la dosis biológicamente efectiva, o que amplifique el efecto en el tejido blanco, puede ser un marcador biológico de susceptibilidad incrementada (Harden, 1990). La clasificación y determinación de los marcadores de susceptibilidad es controversial dada su naturaleza, y en la mayoría de los casos pasan inadvertidos aún en estudios epidemiológicos muy precisos.

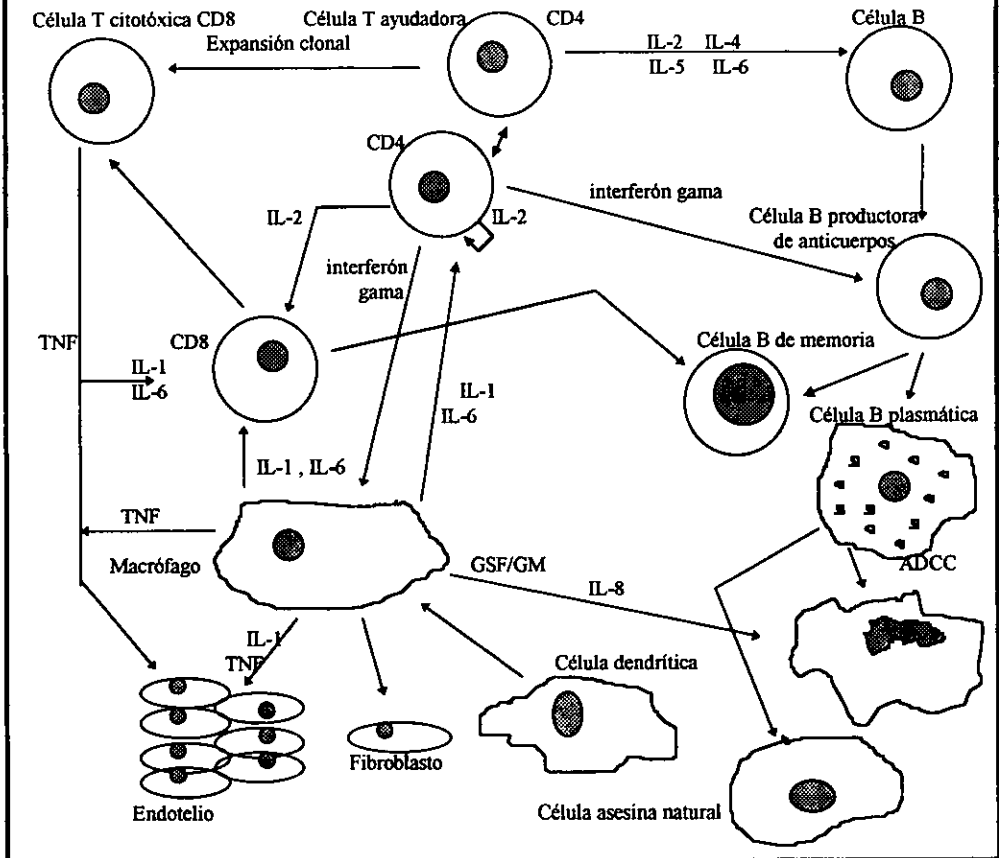
Estos marcadores se encuentran relacionados generalmente a algunos procesos enzimáticos deficientes. Algunas de las más importantes fuentes de variación en la susceptibilidad entre los individuos son los factores genéticos del individuo, tales como la presencia de ciertos polimorfismos o la activación específica de algunos oncogenes; los factores ambientales que rodean al individuo (lugar de residencia, ocupación, etc) (Holt y Keast, 1977; Stiller-Winkler et al., 1989); factores fisiológicos particulares (estrés, embarazo, envejecimiento) (Lewis et al., 1978), y algunos hábitos como el fumar, el alcoholismo o presentar una mala nutrición (Corre et al., 1971; Holt y Keast, 1977; Ferson et al., 1979; Warren et al., 1982; Chandra, 1987; Dominioni y Dionigi, 1987; Rogers y Newberne, 1987; Klasing, 1988; Chandra y Wadhwa, 1989). Todos estos factores pueden influenciar la respuesta de un organismo ante la exposición a un xenobiótico, por lo tanto son importantes al hacer consideraciones sobre los efectos de ciertos xenobióticos sobre sistemas *in vivo* o *in vitro*.

Los marcadores biológicos de susceptibilidad han tenido un gran desarrollo a partir de estudios epidemiológicos a nivel molecular, se ha podido observar que en ciertos casos, existe una asociación muy fuerte entre el desarrollo de enfermedades particulares y un fenotipo específico. Tal es el caso del cáncer de pulmón, que se ha encontrado una asociación entre el tabaquismo y una actividad mayor del citocromo p450 1A1.

## EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune es un complejo mecanismo intra -e interregulado. Las células inmunes, dirigidas por sus receptores y productos de secreción, actúan como una red (figura 1). Aunque el sistema inmune es generalmente considerado autónomo, existe una gran cantidad de evidencias

**Figura 1.** Interacciones principales en el sistema inmune (modificado de Abbas, 1994 ).



de que existe una interacción recíproca entre los sistemas nervioso, endócrino e inmune para mantener la homeostasis en los organismos (Blalock, 1989).

El sistema inmune está conformado por varios tipos celulares, que se interregulan a través de una compleja cadena de factores de secreción (citocinas) y la relación con sus receptores específicos (Clark y Ledbetter, 1994).

Existen dos clases principales de linfocitos en el sistema inmune: los T y los B (tabla 2). En el humano, los linfocitos T se diferencian en el timo, y los linfocitos B en la médula ósea. Ambos tipos de células, y varios subtipos de las mismas, pueden ser reconocidos a nivel molecular gracias a los diferentes marcadores de membrana y receptores que expresan (tabla 3).

**Tabla 2. Porcentajes normales de linfocitos en sangre periférica de humanos adultos.**

<b>Tipo celular</b>	<b>Función</b>	<b>Marcadores de fenotipo</b>	<b>%</b>
<b>Linfocito B</b>	Producción de anticuerpos, inmunidad humoral	CD19, CD22	10-15
<b>Linfocito T</b>	Estimula el crecimiento y diferenciación de células B	CD3 <sup>+</sup>	80-70
<b>T ayudadores</b>	Activación de macrófagos, secreción de citocinas, inmunidad celular	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>-</sup>	50-60
<b>T citotóxicos</b>	Activación de macrófagos, lisis de células infectadas, tumorales y alogénicas, inmunidad celular	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup>	20-25
<b>Células Asesinas Naturales</b>	Lisis de células infectadas y tumorales, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	Receptor Fc para IgG CD16	<10

Los linfocitos T están divididos en dos subpoblaciones principales: los linfocitos T ayudadores (CD4<sup>+</sup> o Th), y los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup> o CTL). Cuando los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen por medio del receptor de célula T (TCR), un antígeno específico asociado al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), en una célula presentadora de antígeno (CPA), el linfocito es capaz de entrar a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (figura 2), y de secretar factores de crecimiento llamados linfocinas (IL-2, IL-3, TGF-β, etc), cuyas funciones son la amplificación de la respuesta inmune mediante la activación, proliferación, atracción y diferenciación de los mismos linfocitos T, los linfocitos B, los macrófagos y otras células del sistema inmune (Roitt *et al.*, 1996).

Los linfocitos T CD4 vírgenes producen principalmente IL-2 al encuentro inicial con un antígeno. La estimulación antigénica permite la diferenciación de estas células en una población llamada Th0, que produce múltiples citocinas, esta población se diferencia subsecuentemente en subtipos llamados Th1 y Th2, que presentan perfiles de citocinas y funciones efectoras relativamente restringidas. Las células Th1 secretan IL-2 e IFN $\gamma$ , que activan a los macrófagos, y son los principales efectores de la inmunidad celular contra microbios intracelulares y de las reacciones de hipersensibilidad retardada. Los isotipos de anticuerpos estimulados por las células Th1 son eficientes en la activación del complemento y en la opsonización de antígenos para la fagocitosis.

**Tabla 3. Principales mediadores de la activación de linfocitos.**

Citocina	genes	Tamaño del péptido	Fuente celular	Blanco celular	Efecto primario
<b>IL2</b>	1	14-17 kD monómero	Células T	Células T Células asesinas naturales Células B	Crecimiento, producción de citocinas Activación y crecimiento Crecimiento, síntesis de anticuerpos
<b>IL4</b>	1	20 kD monómero	Células T CD4 <sup>+</sup>	Células B Macrófagos Células T	Cambio de isotipo a IgE Inhibición de la activación Crecimiento
<b>TGF β</b>	varios	14 kD dímero	Células T, Macrófagos	Células T Macrófagos Otros tipos celulares	Inhibición de la activación y la proliferación Inhibición de la activación Regulación del crecimiento

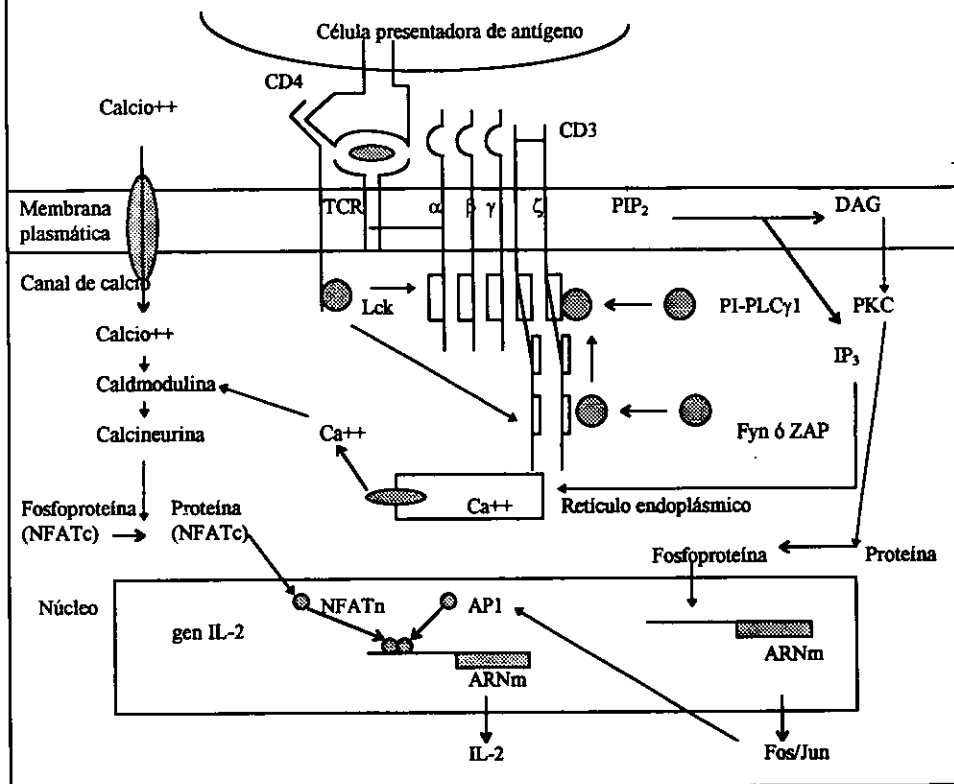
Por otro lado, las células Th2 producen IL-4, que estimula la producción de anticuerpos IgE, IL-5 (factor activador de eosinófilos), IL-10 e IL-13 (que junto con la IL-4 suprimen la inmunidad celular). Las células Th2 son eficientes en contra de infecciones parasitarias como las causadas por helmintos, y son responsables de las reacciones alérgicas, que son debidas a la activación dependiente de IgE de células cebadas y basófilos (*Mosmann et al., 1986*).

Los subtipos de linfocitos Th0, Th1 y Th2 se identificaron originalmente en clones de células T CD4 de ratón. Los principales factores que dirigen la diferenciación de células T CD4 vírgenes en células Th1 o Th2 son las citocinas, el tipo de célula presentadora de antígeno y la naturaleza y cantidad del antígeno con que se encuentran inicialmente. La IL-12 y el IFN $\gamma$  promueven el desarrollo de células Th1, al igual que la presentación de antígenos por macrófagos. En contraste, la IL-4 promueve el desarrollo de células Th2. Aún no se conocen todos los factores relacionados con el proceso de esta diferenciación específica (*Mosmann y Coffman 1989*).

Se ha observado que hay ciertas subpoblaciones de linfocitos T que pueden funcionar también como reguladoras de la respuesta humoral mediante la secreción de factores inductores de supresión (*Devens et al., 1991*).



**Figura 2.** Vías de señalización intracelular en la activación de linfocitos T (tomado de Abbas, 1994).



Por su parte, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se encargan de lisar a las células que presentan un antígeno específico asociado al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I), como por ejemplo las células tumorales y las infectadas por virus (Roitt *et al.*, 1996).

Generalmente es necesaria la interacción entre varios grupos celulares para la activación del sistema inmune. Esta comunicación se realiza a través de las citocinas, que funcionan como señales intercelulares (Bick, 1985).

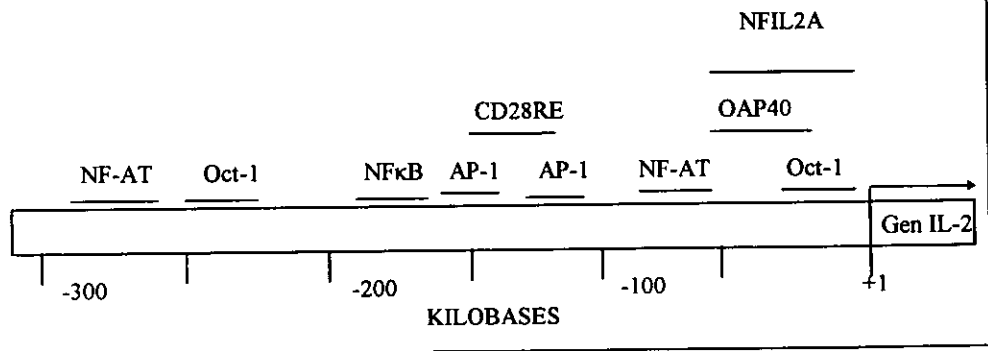
Una de las citocinas más conocidas hoy en día, y que ha demostrado tener un papel central en la respuesta inmunológica, es la interleucina 2 (IL-2) (Smith, 1989; Swain, 1991). Esta glucoproteína es sintetizada principalmente por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, aproximadamente 50 minutos después de que el linfocito ha sido activado en respuesta a un antígeno o a un mitógeno (Abbas *et al.*, 1994). El gen que codifica para esta citocina consta de 5737 pares de bases en el humano y se encuentra localizado en el locus 4q26-27. El resultado de la transcripción de este gen

es un ARN heterólogo nuclear con tres intrones y cuatro exones, los que dan como resultado de la maduración un ARN mensajero de 844 bases (GenBK, Acc: J002265; GenBank, Acc: X01586). La estructura cristalográfica de esta proteína ha sido dilucidada hasta los 3.0 Å de resolución, revelando que está formada principalmente por hélices  $\alpha$  antiparalelas (Brandhuber et al., 1987), y que entre los residuos 58 y 105 se forma un puente disulfuro (Cys-Cys), que al reducirse elimina la actividad biológica de la proteína (Ciardelli et al., 1987).

Para que la IL-2 lleve a cabo todas sus funciones, es necesario que interaccione con el receptor de IL-2 presente en la membrana de las células activadas. Este receptor está formado por al menos tres subunidades que poseen, cada una de ellas, una baja afinidad por el ligando: la subunidad  $\alpha$  (CD25) de 55 kD, posee una afinidad de  $1 \times 10^{-8}$  M, la subunidad  $\beta$  de 75 kD, tiene una afinidad de  $1 \times 10^{-9}$  M; esta proteína contiene el dominio citoplásmico encargado de la transducción de la señal mitogénica por medio de la fosforilación de los residuos de tirosina 338 y 510 (Kono et al., 1993; Goldsmith et al., 1995), existe una tercera subunidad,  $\gamma$  de 64 kD, que también se asocia al receptor de otras citocinas, tales como los de la IL-4 y la IL-7. Al interaccionar estos tres polipéptidos por fuerzas no covalentes, se forma el receptor de IL-2 de alta afinidad ( $1 \times 10^{-11}$  M) (Izquierdo et al., 1995).

La vida media del receptor de IL-2 en la membrana celular, en ausencia de su ligando, es de 150 minutos. Cuando el ligando se encuentra presente, la vida media se reduce a 15 minutos. Debido a esto, y al tiempo en que tarda en sintetizarse y expresarse en la membrana un nuevo receptor, la concentración en la membrana disminuye de un 50 a un 60% en el par de horas siguientes a la presencia inicial de la 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), no se ha observado que este complejo sea reciclado puesto que los endosomas que lo contienen se fusionan en el citoplasma con lisosomas en donde son degradados por proteasas ácidas (Smith, 1989).

**Figura 3.** Secuencias de unión de factores nucleares en la transcripción del gen de Interleucina 2 (tomado de Abbas, 1994).



Cuando el linfocito T se activa en respuesta a un antígeno, el complejo conocido como CD3, formado por varias cadenas proteicas y asociado al TCR, inicia una cascada en la que se activan una gran variedad de sustratos (Lck, ZAP-70, PLC $\gamma$ 1, p36, p75, Grb2, Sos, p21ras, Raf-1, PKC, entre otros), 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 de genes, tales como los de IFN- $\gamma$ , IL-2, p28, IL-3, IL-6, c-myc, etc (Izquierdo *et al.*, 1995; Robey y Allison, 1995) (figura 3). La IL-2 es un factor necesario para la progresión del ciclo celular de los linfocitos de la fase G<sub>1</sub> a S (Klaus y Hawrylowicz, 1984).

La cantidad de IL-2 secretada por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> es un factor determinante en la magnitud de la respuesta inmune (Swain, 1991), ya que participa en la regulación de células activadas por antígenos, estimula el crecimiento de células NK, estimula la secreción de anticuerpos e induce la secreción de IFN- $\gamma$  en células NK y T CD8<sup>+</sup>. El papel central de la IL-2 en la respuesta inmune queda demostrado con el hecho de que existen cuadros clínicos de inmunodeficiencia combinada severa debidos, exclusivamente, a defectos en la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T (Weinberg y Parkman, 1990) (tabla 4).

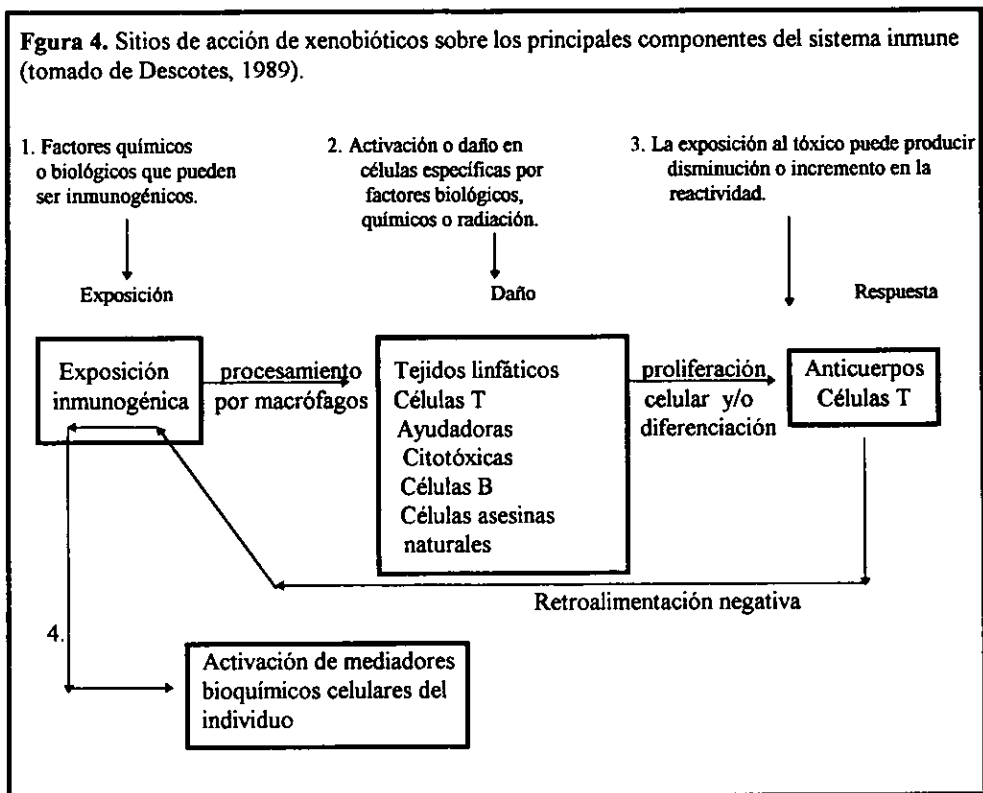
**Tabla 4. Ejemplos de enfermedades de inmunodeficiencia combinada severa de células T.**

<b>Enfermedad</b>	<b>Deficiencias Funcionales</b>	<b>Defecto Propuesto</b>
<b>Síndrome de DiGeorge</b>	Disminución de células T y de Ig séricas, células B normales	Hipoplasia del timo, desarrollo anormal del 3er y 4o nódulos branquiales
<b>SCID ligada al X</b>	Disminución marcada de células T y de Ig séricas, incremento de células B	Mutación de la cadena y del gen del receptor de IL-2, maduración defectuosa de células T
<b>SCID autosómica recesiva</b>	Disminución de células T y B y de Ig séricas	Maduración deficiente de células T y B
<b>SCID deficiente en ADA</b>	Decremento progresivo de células T y B, reducción de Ig séricas	Acumulación de metabolitos tóxicos por deficiencia de ADA
<b>SCID deficiente en PNP</b>	Disminución de células T, células B normales e Ig normales	Acumulación de metabolitos tóxicos en células T por deficiencia de PNP
<b>SCID deficiente en MHC clase II</b>	Números normales de linfocitos, Ig séricas disminuidas, inmunidad mediada por células deficiente	Transcripción de genes del MHC clase II deficiente
<b>Disgenesia Reticular</b>	Decremento marcado de células T, B y otras células sanguíneas, reducción de Ig séricas	Maduración deficiente de las células del sistema hematopoiético
<b>Ataxia-telangiectasia</b>	Reducción de células T, células B normales, reducción en IgA, IgE y algunas subclases de IgG	Defecto en la reparación del ADN

## EFFECTO DE LOS XENOBIÓTICOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE

La interacción de ciertas sustancias químicas ambientales y drogas con los tejidos linfoides puede alterar el delicado balance del sistema inmune y puede producir cinco tipos de efectos adversos: 1) inmunosupresión, 2) proliferación descontrolada, 3) alteraciones de los mecanismos de defensa contra patógenos y neoplasias, 4) alergias y 5) autoinmunidad (Dean y Murray, 1991).

Los xenobióticos pueden actuar en varios puntos dentro de la compleja red de la respuesta inmune (figura 4). Las células de la médula ósea son, por lo general, las células más sensibles a los efectos de los xenobióticos debido a su alta tasa de proliferación, pudiéndose producir una supresión profunda del sistema inmune cuando estas células son afectadas directamente (NRC, 1992).



Se sabe que algunos xenobióticos son capaces de inducir autoinmunidad, pero existe poca evidencia que relacione la aparición de estas enfermedades con exposiciones ambientales (Petz y Gattarry, 1980).

Aún cuando alguno de los compartimentos del sistema inmune puede ser significativamente suprimido, esto no necesariamente se manifiesta clínicamente como una enfermedad específica del sistema inmune. Un estado de inmunosupresión puede representar un riesgo potencial, puesto que la habilidad del individuo para combatir enfermedades, tanto naturales como adquiridas, se ve disminuida (Dean y Murray, 1991).

Existe poca información que sugiera que los individuos expuestos a contaminantes ambientales tengan una mayor incidencia de enfermedades infecciosas o que se encuentren inmunológicamente comprometidos, sin embargo, ya se ha establecido claramente que el tratamiento con drogas inmunosupresoras aumenta la incidencia de enfermedades infecciosas y de desarrollo de cáncer, en particular de piel (Walder et al., 1971; Penn, 1988; Watson, 1988). Otro caso de evidencias que asocian ciertos padecimientos con exposiciones ambientales, es el de la exposición a ozono, que disminuye la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con mitógenos (Peterson et al., 1981) (tabla 5).

**Tabla 5. Alteraciones inmunológicas asociadas a la exposición a solventes orgánicos, químicos industriales y contaminantes atmosféricos.**

<b>XENOBIÓTICO</b>	<b>ALTERACIÓN ASOCIADA</b>
<b>Amosita</b>	Disminuye la proliferación celular en respuesta a PHA (Barbers et al., 1982)
<b>Asbesto</b>	Reduce la proporción CD4:CD8 (Lew et al., 1986)
<b>Benceno</b>	Disminuye la proliferación celular en respuesta a PHA (Thurman et al., 1978)
<b>Benzidina</b>	Deprime la inmunidad celular (Gorodilova y Mandrik, 1978)
<b>Bifenil policlorinado</b>	Enfermedades autoinmunes de tiroides (NRC, 1992)
<b>Cloruro de vinilo</b>	Esclerosis sistémica (NRC, 1992), disminuye la proliferación celular en respuesta a Con A (Thurman et al., 1978)
<b>Crisolita</b>	Disminuye la proliferación celular en respuesta a PHA (Thurman et al., 1978)
<b>Crocidolita</b>	Disminuye la proliferación celular en respuesta a PHA (Thurman et al., 1978)
<b>Dimetil-sulfóxido</b>	Disminuye la muerte intracelular de <i>E. coli</i> (Czuprynsky et al., 1984) y <i>S. aureus</i> en linfocitos PMN (Repine et al., 1981)
<b>Eugenol</b>	Disminuye la quimiotaxis de linfocitos PMN (Lee et al., 1979)
<b>Hidrazina</b>	Lupus eritematoso sistémico (NRC, 1992)
<b>Ozono</b>	Disminuye la proliferación celular en respuesta a PHA (Peterson et al., 1981)
<b>Sílica</b>	Esclerosis sistémica (NRC, 1992)

Muchos tipos de alteraciones inmunes se han observado en animales expuestos a sustancias químicas, a dosis en las que la toxicidad directa no es aparente. La hipersensibilidad causada por químicos ambientales y por exposición ambiental es ampliamente reconocida. Los metales también han estado involucrados en varias respuestas de hipersensibilidad. Algunos individuos expuestos a níquel y otros metales utilizados en la joyería han desarrollado hipersensibilidad por contacto al platino, al oro y al cromo (Goyer, 1991).

### INMUNOTOXICIDAD DE LOS METALES

Los metales constituyen un grupo importante de contaminantes que están fuertemente relacionados con el medio ambiente y las actividades humanas. Su toxicidad varía enormemente con su estado químico, sus propiedades fisicoquímicas, con la transformación sufrida en el medio ambiente y con los niveles de exposición, entre otros aspectos (NRC, 1992).

Aunque se pudiera pensar que los metales son sustancias relativamente estables, cuando interaccionan con otras sustancias o estructuras celulares, sus efectos pueden verse incrementados o abatidos. Por ello, es importante considerar que los mecanismos por los que una sustancia, compuesto o elemento químico, puede llevar a cabo su acción están, en la mayoría de los casos, relacionados con otras estructuras químicas capaces de interaccionar entre sí y desencadenar un efecto biológicamente considerable (Goyer, 1991).

**Tabla 6. Alteraciones inmunológicas asociadas a la exposición a metales.**

METAL	ALTERACIÓN ASOCIADA
Aluminio	Disminuye la quimiotaxis de linfocitos PMN (NRC, 1992)
Arsénico	Disminuye la proliferación de linfocitos T en respuesta a PHA (Gonsebatt et al., 1992)
Cadmio	Glomerulonefritis (NRC, 1992)
Cloruro de Cadmio	Disminuye la proliferación de linfocitos T en respuesta a PHA y PWM (Kastelan et al., 1981), la linfocitotoxicidad y la respuesta ADCC (Stacey, 1986)
Litio	Enfermedad autoinmune de tiroides (NRC, 1992)
Mercurio	Glomerulonefritis (NRC, 1992)
Oro	Glomerulonefritis (NRC, 1992)
Plomo	Disminuye IgA en saliva (Ewers et al., 1982), altera la respuesta a PHA (Jaremin, 1983), aumenta células T supresoras (Cohen et al., 1989; Wagnerová et al., 1986)
Selenio	Aumenta la fagocitosis de levaduras en linfocitos PMN (Urnab y Jarstrand, 1986)
Zinc	Disminuye la proliferación de linfocitos T en respuesta a PHA (Berger y Skinner, 1974), a Con A (Rao et al., 1979), la linfocitotoxicidad, disminuye la producción de superóxido en linfocitos PMN, disminuye la respuesta ADCC (Beswick et al., 1986).

Existe una gran cantidad de información sobre las propiedades inmunosupresoras de los metales (tabla 6). Los metales pesados son agentes alquilantes de grupos sulfhidrilos, y como tales, pueden unirse con una gran afinidad a muchas biomoléculas que posean grupos sulfhidrilos, interfiriendo de esta manera con la comunicación celular al alterar varias de las propiedades de las membranas, y de esta manera, producir una inmunosupresión (Ewers et al., 1982; Jaremin, 1983; Wagnerová et al., 1986; Cohen et al., 1989).

Se ha observado que los efectos inmunosupresores del plomo pueden eliminarse al adicionar grupos tioles exógenos *in vitro* (Wolfe et al., 1994). Por otro lado, también se ha reportado que el hierro interfiere con el reconocimiento de los ligandos de moléculas CD4<sup>+</sup> en linfocitos T, afectando la activación del linfocito (Santos y De Sousa, 1994).

La exposición sistémica a los metales puede afectar adversamente la respuesta inmune y alterar la resistencia del individuo a agentes infecciosos y tumores. La supresión de esta resistencia es una de las aberraciones más consistentes en la inmunotoxicidad inducida por metales. Al parecer la gran mayoría de los metales comparten mecanismos de acción similares (Ward et al., 1975; Koller, 1990).

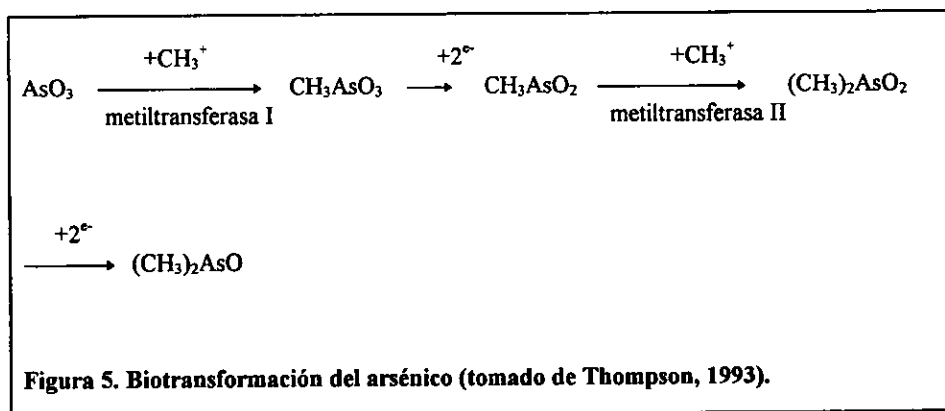
El cadmio altera la susceptibilidad a endotoxinas bacterianas y disminuye el número de células productoras de anticuerpos (Kastelan et al., 1981; Koller, 1990). Un efecto similar se reporta con la exposición a mercurio (Koller, 1990). También se ha determinado que la exposición a metales puede producir reacciones de hipersensibilidad y aún desencadenar procesos autoinmunes (Stacey, 1986; Goyer, 1991). Ya se ha establecido que, en muchos casos, el mismo compuesto puede producir efectos contrarios, generalmente dependiendo de la dosis en que son administrados, o de la concentración que puede constituir la dosis biológicamente activa (NRC, 1992).

Uno de estos elementos es el arsénico (As). Se han reportado casos en los que, muy pequeñas dosis de esta sustancia, son capaces de estimular la proliferación inducida por mitógenos de los linfocitos expuestos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Elinder et al., 1987), y casos en los que, dosis ligeramente mayores, pueden disminuir esta respuesta (Gonsebatt et al., 1992).

## EL ARSÉNICO

Este metaloide se encuentra en la naturaleza formando parte de minerales tales como los arsenuros de cobre, níquel, hierro, o como sulfuro u óxido de As. Este elemento se encuentra también en dos estados de oxidación, As (V<sup>+</sup>) y As (III<sup>+</sup>), en fuentes de agua que se encuentran en contacto con sedimentos ricos en sales. El As se emplea de varias formas en la industria; en la producción de pesticidas, en plantas fundidoras de cobre, oro, plomo y antimonio, en plantas generadoras de electricidad por medio de combustión de carbón mineral, en la fabricación de medicamentos antiparasitarios y en fábricas de componentes electrónicos, que utilizan arsenuro de galio como semiconductor (Bencko, 1987; Vahter, 1988; Burns y Munson, 1993; Diaz-Barriga et al., 1993).

El *As* se incorpora al organismo por ingestión o por inhalación, ya que la absorción a través de la piel resulta mínima (Vahter, 1988). Cuando se encuentra en solución es más rápidamente incorporado que en estado sólido. Las formas inorgánicas son metabolizadas a través de reacciones de óxido-reducción y metilación (figura 5) (Scott et al., 1994; Thompson, 1993). También se ha descrito que el glutatión reducido es el donador de electrones para la reducción de compuestos arsenicales y por lo tanto, para su eliminación de las células (Buchet y Lawwrey, 1985).



Diversos estudios epidemiológicos en poblaciones humanas han demostrado que la exposición a *As* 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). Por otro lado, la intoxicación aguda con *As* inorgánico produce distintos tipos de lesiones, la principal es el daño al sistema digestivo, provocando vómito y diarrea, además de edema facial, calambres y anomalías cardíacas (WHO, 1981). La exposición subaguda a compuestos arsenicales en el aire daña las mucosas del sistema respiratorio y la piel, a lo que se suman 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), y con 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 de piel, vejiga, hígado y riñón, o broncogénico 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 reducida en comparación a la encontrada en individuos no expuestos, también se ha comprobado su actividad genotóxica (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 arsenuro de galio suprime la producción de anticuerpos, además de inhibir la proliferación de los linfocitos T y alterar la expresión de la cadena alfa del receptor para IL-2 (CD25) (Burns y Munson, 1993).

Se han encontrado en estudios realizados en ratones con infecciones virales expuestos a compuestos arsenicales, dos tipos de efecto 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-hidroxi-3-nitrobenzenarsónico, pero no así con ácido p-arsanílico; por otro lado, también se ha observado que, en ratones infectados con el virus de "Western" encefalitis y tratados con arsenito de sodio, la mortalidad debida a la infección se reduce.

En un modelo animal iniciado (predispuesto) de cáncer de piel, se ha demostrado que el arsenito de sodio actúa como un potenciador de la carcinogénesis a través de la modulación de la expresión de ciertos genes relacionados con el desarrollo y crecimiento tumoral (TGF $\alpha$ ), este modelo iniciado es un ratón transgénico (FVB TG.AC hembras homocigas) con el promotor del gen de globina- $\alpha$  fetal fusionado al gen estructural de v-Ha-ras (con mutaciones en los codones 12 y 59) y unido a la secuencia 25 de poliadenilación del virus SV40 (Germolec *et al.*, 1997).

Debido a que el As inorgánico tiene efecto sobre el sistema hematopoyético, ha sido utilizado durante mucho tiempo como un agente terapéutico para varias formas de leucemia, a menudo en dosis de varios mg/día (WHO, 1981).

Algunos de los mecanismos bioquímicos por medio de los que el As actúa han sido dilucidados. Se ha encontrado que el As (III<sup>+</sup>), lleva a cabo su acción citotóxica por medio de su reacción con 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 de esta manera (Aposhian, 1989). Por otro lado, también 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<sup>+</sup>), está presente, la célula es incapaz de producir, por medio de la glicólisis, la cantidad suficiente de ATP para llevar a cabo sus funciones. Se cree que esto se debe a que el As pentavalente es similar, en estructura, al fosfato inorgánico, y que puede sustituirlo en diversas reacciones metabólicas (Aposhian, 1989).

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Existen evidencias de la relación establecida entre los estados de inmunosupresión, tanto heredados como adquiridos, con la aparición de tipos particulares de cáncer de piel. Aún no se ha determinado cual es el mecanismo que relaciona estos dos padecimientos.

El *As* es un carcinógeno humano, este metaloide se encuentra ampliamente distribuido en el planeta, y existen varias poblaciones humanas expuestas a altas concentraciones de él. La exposición a *As* en el agua potable se ha asociado con un incremento en el riesgo de la aparición de cáncer de riñón, de vejiga y, particularmente, de piel.

En poblaciones humanas expuestas a *As* en el agua de bebida se ha encontrado que, en los cultivos de linfocitos de estos individuos, se observa una frecuencia de respuesta mitogénica menor que en individuos testigo (índice mitótico e índice de marcaje), lo que indica que existe una disminución en cuanto a la respuesta de activación de los linfocitos T en los individuos crónicamente expuestos, y que esto podría representar un estado de inmunosupresión celular.

### HIPÓTESIS

Si el *As* produce una baja respuesta en la proliferación inducida por mitógenos en linfocitos humanos, tanto *in vivo* como *in vitro*, entonces el *As* podría estar interfiriendo con alguno de los procesos de activación del linfocito, tales como la síntesis y secreción de la interleucina 2 (factor clave en la progresión del ciclo celular), o la síntesis y expresión del receptor para IL-2 (CD25), causando de esta manera un estado de inmunosupresión celular.

### OBJETIVOS GENERALES

- 1) Determinar si el arsenito de sodio puede producir un estado de inmunosupresión celular.
- 2) Determinar si el arsenito de sodio interfiere con la síntesis y/o secreción de IL-2 y con la expresión del receptor para IL-2.
- 3) Determinar si existen cambios en las subpoblaciones linfocitarias debidos a la exposición a arsenito de sodio.
- 4) Determinar si los efectos observados en linfocitos humanos son reproducibles en un modelo experimental animal.

## **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

- a) Cuantificar la secreción de IL-2 en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio por medio del bioensayo de células CTLL-2.
- b) Determinar la expresión del receptor de IL-2 en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio y de células de bazo de ratones tratados *in vivo* por medio de inmunofluorescencia y análisis citofluorométrico.
- c) Determinar la inducción del gen de IL-2 en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio por medio de la cuantificación del ARN mensajero para dicho gen.
- d) Cuantificar la IL-2 intracelular en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio por medio del bioensayo de células CTLL-2.
- e) Establecer los cambios en la proliferación celular en cultivos de linfocitos humanos, células CTLL-2 y P3X63.Ag8.653 tratados *in vitro* con arsenito de sodio y en células de bazo de ratones tratados *in vivo* por medio de la incorporación de timidina tritiada.
- f) Determinar la viabilidad celular en cultivos de linfocitos humanos, células CTLL-2 y P3X63.Ag8.653 tratados *in vitro* con arsenito de sodio por medio de la producción de metabolitos de MTT y exclusión de azul tripano.
- g) Definir las subpoblaciones linfocitarias en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* y de células de bazo de ratones tratados *in vivo* con arsenito de sodio por inmunofluorescencia y análisis citofluorométrico.

### **CAPÍTULO III**

#### **Artículo I**

**The Immunosuppressant Effect of Sodium Arsenite on Human Lymphocytes *in vitro*.**

**I. Alteration on Interleukin-2. Vega L., Ostrosky-Wegman P., Montes de Oca P., Fortoul T., Saavedra R.**

**Aceptado en Toxicology and Health Sciences**

#### **Artículo II**

**The Immunosuppressant Effect of Sodium Arsenite on Human Lymphocytes *in vitro*.**

**II. Inhibition of IL-2 protein secretion. Vega L., Diaz C., Madrid V., Saavedra R., Ostrosky-Wegman P.**

**Enviado a Toxicology and Health Sciences**



## **THE IMMUNOSUPPRESSANT EFFECT OF SODIUM ARSENITE ON HUMAN LYMPHOCYTES *IN VITRO*. I. ALTERATION ON INTERLEUKIN-2 .**

**Libia Vega, Patricia Ostrosky-Wegman, Pável Montes de Oca,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Genética Toxicológica,  
UNAM, México, D.F. México.**

**Teresa I. Fortoul,  
Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Tisular, UNAM, México, D.F.  
México.**

**and Rafael Saavedra.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología, UNAM, México,  
D.F. México.**

### **INHIBITION OF IL-2 SECRETION BY SODIUM ARSENITE**

**Address correspondence to P. Ostrosky-Wegman, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Depto. Genética Toxicológica, UNAM, Circuito Escolar Interior, Apdo. Postal 70228, C.P.  
04510, México D.F., México. Fax: (52-5) 622-3365. E-mail: ostrosky@servidor.unam.mx**

### **ABSTRACT**

Arsenic (As) is a common metalloid which contaminates drinking water in several regions of the world and chronic exposure is associated with skin, lung, bladder, and kidney cancer. Previous studies suggest that arsenic exposure leads to a diminution of phytohemagglutinin (PHA) stimulated T cell proliferation in humans. In order to understand the mechanism of this suppression, the effect of As was evaluated on the expression of IL-2 receptor, and IL-2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). the morphological changes induced by As were also studied on lymphocytes by electron microscopy (EM). Inhibition of cell proliferation was observed in all donors studied. PHA-stimulated PBMC expressing CD25, was slightly decreased in only 2 donors, the other donors did not show any change in CD25 expression. However, IL-2 secretion was inhibited in 6 donors. Proliferative inhibition was due to a suboptimal IL-2 concentration secreted by lymphocytes, since the addition of hrIL-2 to the lymphocyte cultures reversed, in a concentration-response fashion, the inhibitory effect of As. EM analysis revealed that cellular ultrastructure is altered by arsenic with alterations in Golgi apparatus, mitochondria, derangement of cytoskeleton, and perinuclear membrane. These alterations were related to an inhibition of protein transport within the cell. Different individual susceptibilities were observed among donors that might be due to genetic differences in the methylation enzymes and appear to be sex-related.

## INTRODUCTION

Arsenic (As) is a common metalloid which contaminates drinking water in several regions of the world, and occupational As exposure also has been reported, especially in smelter workers (Nordenson and Beckman, 1982). Arsenic has been recognized as a human carcinogen (IARC, 1980) and chronic exposure is usually associated with skin and lung cancer, as well as bladder and kidney cancer, blackfoot disease and gastrointestinal disorders (Chen and Wang, 1990; Börzönyi et al., 1992).

Arsenic compounds possess clastogenic and co-mutagenic activity (Okui and Fujiwara, 1986). It has been demonstrated that As induces chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in non-human cells (Wan et al., 1982), as well as in human lymphocytes *in vitro* (Gonsebatt et al., 1992). Lymphocytes from individuals chronically exposed to As via drinking water were found to have higher frequencies of chromosomal aberrations than lymphocytes from healthy individuals (Ostrosky-Wegman et al., 1991). Recent studies demonstrated that the lymphocyte replicating ability induced by phytohemagglutinin (PHA) in these chronically exposed individuals was reduced (Gonsebatt et al., 1994). In addition, As was found to induce mitotic arrest (Vega et al., 1995), and interfere with microtubule assembly (Ramírez et al., 1997).

With respect to the immunological effects of arsenic compounds, an increased susceptibility to infections with pseudorabies and encephalitis virus has been found in mice treated with sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ), arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), or sodium arsenate ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ) (Gainer and Pry, 1972). When mice were exposed to gallium arsenide (GaAs), IgM production was decreased in 97% of animals, and macrophage activity was also reduced (Sikorsky et al., 1989). A similar effect was observed when  $\text{NaAsO}_2$  was used (Burns et al., 1991). Treatment of mice with 200 mg/kg of GaAs diminishes the Interleukin-2 receptor (CD25) expression (Burns and Munson, 1993). These data suggest that arsenic compounds can affect T cell activation and function, probably by interfering with primary or secondary signals that direct antigenic responses (Zelikoff et al., 1994), and thus compromise the immune response.

In order to understand the mechanism of action by which As induces a diminution of PHA stimulated T cell proliferation, the effect of  $\text{NaAsO}_2$  was evaluated on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro* on the expression of Interleukin-2 receptor (CD25) and secretion of Interleukin-2 (IL-2), which are primary events in the activation and proliferation of T cells.

It has been reported that cytokine production in activated cells produces specific changes in lymphocyte morphology, particularly in the Golgi apparatus (Agren et al., 1996; Björk et al., 1996), which structure is maintained by the cytoskeleton (Yamashina, 1995). As  $\text{NaAsO}_2$  can alter the cytoskeleton by interfering with tubuline assembly (Ramírez et al., 1997), the morphological changes induced by arsenic treatment were also studied on lymphocytes by electron microscopic analysis.

## **METHODS**

### **Subjects**

Blood donors were laboratory staff members, 24-38 years old (4 males and 3 females), which had not taken any drug for at least one month before sampling, and who had no medical history of immune-mediated diseases. PBMC were isolated by density centrifugation using Ficoll-Hypaque (Sigma), and washed twice with fresh RPMI 1640 medium (Sigma); autologous plasma was used for each donor culture.

Lymphocytes were obtained from each donor on at least three separate occasions, and each experimental determination, including viability, proliferation, IL-2 secretion, and CD25 expression were repeated for each donor in triplicate.

### **Culture media**

All reagents were obtained from Sigma. PBMC were cultured in RPMI 1640 supplemented with L-glutamine (2 mM), non-essential amino acids (10 mM), and 10 % autologous plasma (complete medium). CTLL-2 cells were maintained in RPMI 1640 media supplemented with L-glutamine, non-essential amino acids, 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco), and 2 international units of human recombinant IL-2/ml (Boehringer).

### **Cell culture**

PBMC were resuspended at  $10^6$  cells/ml in complete medium (supplemented with autologous plasma), and one million cells per well were seeded on a 24-well cell culture plate (Costar), and incubated at 37 °C, and 5 % CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere; NaAsO<sub>2</sub> (0.01, 0.1 and 1 μM in distilled water) was added directly to the cell cultures; After 24 hr lymphocytes were activated with PHA (GIBCO) (2 μg/ml), and incubated for an additional 48 hr.

The same treatment was applied to resting lymphocytes (no PHA) which were incubated for 72 hr. Supernatants of these primary cultures (500 μl/well) were taken 24 hr after activation to measure secreted IL-2. Cells were also harvested for cytofluorometric studies 24 hr later. Parallel cultures were maintained in 96-well culture plates for viability and proliferation determinations (see below).

### **Viability test**

Viability was determined using the MTT test assay. Briefly, 20 μl of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/ml in PBS) were added to each triplicate culture in 96 well-plates and incubated for 4 hr; 100 μl of 10 % SDS in 0.01 N HCl were added to dissolve MTT residues, and the optical density was determined on an ELISA-plate reader (Bio-Rad) at 590 nm: Viable cells metabolize MTT to a blue color which is proportional to viable cells number.

### **Cell Proliferation**

Two hundred thousand cells per well were incubated (in triplicate) in 96-well culture plates in a total volume of 200 μl for 72 hr, under the same conditions as described above. Cells were pulsed with 1 μCi of [<sup>3</sup>H]-thymidine (Du Pont, 6.7 Ci/mmol) for the last 18-20 hr, and were



harvested onto glass-fiber filters by an automatic cell harvester (Skatron). [<sup>3</sup>H]-Thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation spectroscopy on a Betaplate counter (Wallac) to determine cellular response to PHA.

#### **IL-2 determination**

Secreted IL-2 in control and treated cell cultures was determined using the CTLL-2 cell assay as described by Gillis et al. (1978); ten thousand CTLL-2 cells were incubated in a total volume of 200  $\mu$ l of culture medium containing dilutions (1:5, 1:10, and 1:20) of the lymphocyte culture supernatants (primary culture), or dilutions of hr IL-2, for 48 hr at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. Cells were pulsed with 0.5  $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H]-thymidine for the last 12-18 hr and were harvested onto glass-fiber filters: [<sup>3</sup>H]-Thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation spectroscopy.

Results were compared with those obtained using the IL-2 standard and units of IL-2/ml were calculated. Results are expressed as the mean % of IL-2 secretion as compared to untreated cells. No residual sodium arsenite-effect was observed directly on the CTLL-2 cells (data not shown) on viability or proliferation.

#### **CD25 determination**

PBMC were harvested and washed twice with phosphate buffered saline solution (PBS) (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) supplemented with 2% FCS, and 0.1% sodium azide (washing solution). One million cells were resuspended in 100  $\mu$ l of washing solution containing 1  $\mu$ g of the anti-CD25 monoclonal antibody (IgG<sub>1</sub>, clone 2A3, Becton Dickinson), and incubated at 4 °C for 1 hr. Cells were washed twice, and incubated for 1 hr at 4 °C with 1  $\mu$ g of goat anti-mouse IgG FITC-conjugated (Sigma) in 100  $\mu$ l of washing solution. Cells were washed three times, and fixed with 1 % p-formaldehyde in DPBS. Fixed cells were analyzed using a FACScan (Becton Dickinson) with the Lysys II Program.

For each sample, 10,000 cells were analyzed. Results are expressed as the mean % of CD25-positive cells; For each individual, CD25 expression in untreated cells was taken as 100 %.

#### **Electron microscopy (EM) analysis**

Arsenic-treated, resting and PHA-activated lymphocytes, were harvested and washed in PBS twice, and fixed with glutaraldehyde (2 % in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4) for 2 hr. Cells were fixed with 2 % osmium tetroxide, washed with PBS, dehydrated in gradually increased alcohol concentrations (70, 80, 90, and 100 % ethanol), embedded in Araldite 6005, included in beam capsules, and polymerized at 60 °C for 24 hr. Ultrathin sections were obtained, stained with uranyl acetate and Reynolds's lead citrate, and analyzed using a TEM Turbo Zeiss ME 109.

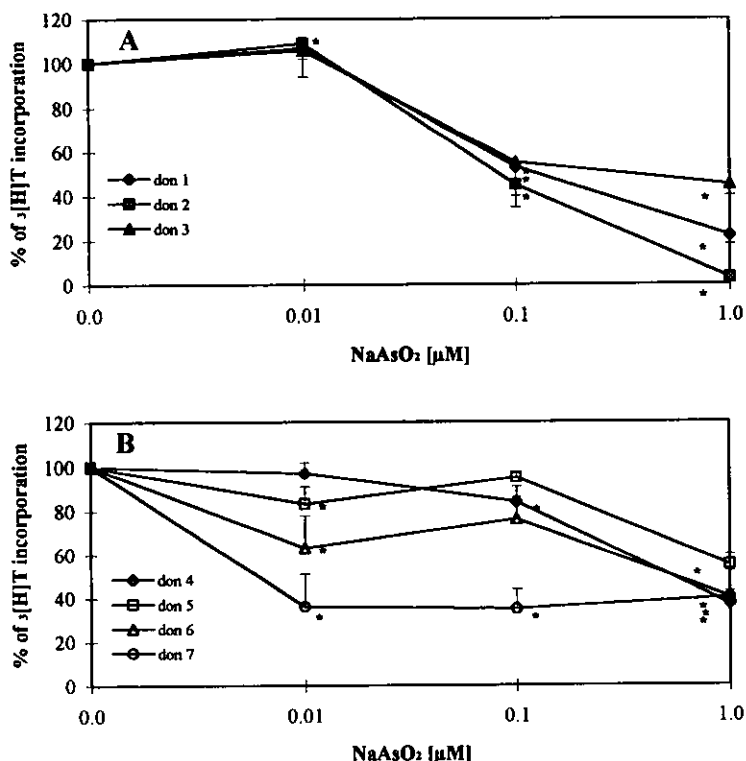
#### **Statistical analysis**

A Student's "t" test was used to determinate the significance of results and a heterogeneous chi-square test was used to determinate the homogeneity of the data obtained from all donors, data were considered as positive when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Effect of sodium arsenite on cell proliferation

The effect of As on human PBMC treated *in vitro* was evaluated by incubation of the cells for 24 hr with three different concentrations of NaAsO<sub>2</sub>, followed by activation for 48 h with PHA. As can be seen in figure 1, an inhibition of cell proliferation, as measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation, was observed in all donors with the highest concentration used (1 μM), although two different patterns of susceptibility were observed among donors; The first group, which includes the 3 female donors, showed an increase of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation with the lowest concentration (0.01 μM NaAsO<sub>2</sub>) (Figure 1A); This effect was not observed in the 4 male donors (Figure 1B), although a mean of 52.8±12.4 % of inhibition occurred in all donors (Table 1).



**FIGURE 1.** Proliferation in human lymphocytes treated *in vitro* with different concentrations of sodium arsenite, and then stimulated with PHA. **A)** female donors 1 to 3, mean control values were: 7720, 4268, and 6133 cpm respectively. **B)** male donors 4 to 7, mean control values were: 17111, 4885, 4676, and 42324 cpm respectively. \*significant different from control  $p < 0.05$ , data represents average of 3 different experiments in triplicate with standard deviation ( $n=9$ ).

**TABLE 1. Mean percent of proliferation, IL-2 secretion and CD25 expression in human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite.**

<b>Males</b>			
<b>NaAsO<sub>2</sub> [<math>\mu</math>M]</b>	<b>% proliferation</b>	<b>%IL-2</b>	<b>% CD25</b>
Control	100 $\pm$ 10.0	100 $\pm$ 8.0	100 $\pm$ 5.3
0.01	70 $\pm$ 22.3	65 $\pm$ 19.5*	99 $\pm$ 9.2
0.1	73 $\pm$ 22.8	51 $\pm$ 12.7*	103 $\pm$ 5.0
1	43 $\pm$ 7.0*	51 $\pm$ 10.5*	91 $\pm$ 10.2
<b>Females</b>			
<b>NaAsO<sub>2</sub> [<math>\mu</math>M]</b>	<b>% proliferation</b>	<b>%IL-2</b>	<b>% CD25</b>
Control	100 $\pm$ 5.0	100 $\pm$ 9.2	100 $\pm$ 2.1
0.01	109 $\pm$ 2.5	73 $\pm$ 12.5	104 $\pm$ 6.2
0.1	51 $\pm$ 4.5*	60 $\pm$ 4.5*	109 $\pm$ 6.6
1	24 $\pm$ 16.0*	45 $\pm$ 15.0*	102 $\pm$ 1.2

X $\pm$ sd; data represents average of all the donors with standard deviation.  
 Males n= 4, Females n=3. \*significant different from control p<0.05

**TABLE 2. Viability of human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite, determined by MTT metabolism assay.**

<b>Donor</b>	<b>Sex<sub>1</sub></b>	<b>O. D. value<sub>2</sub> in control</b>	<b>Control X<math>\pm</math>sd</b>	<b>NaAsO<sub>2</sub> [<math>\mu</math>M]</b>		
				<b>0.01 X<math>\pm</math>sd</b>	<b>0.1 X<math>\pm</math>sd</b>	<b>1.0 X<math>\pm</math>sd</b>
don 1	F	0.526	100 $\pm$ 2	94 $\pm$ 4	84 $\pm$ 8	86 $\pm$ 3
don 2	F	0.388	100 $\pm$ 3	87 $\pm$ 6	96 $\pm$ 3	95 $\pm$ 2
don 3	F	0.444	100 $\pm$ 0	105 $\pm$ 6	88 $\pm$ 5	102 $\pm$ 25
don 4	M	0.576	100 $\pm$ 3	96 $\pm$ 1	92 $\pm$ 3	95 $\pm$ 4
don 5	M	0.641	100 $\pm$ 2	95 $\pm$ 3	97 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1
don 6	M	0.715	100 $\pm$ 5	83 $\pm$ 6	94 $\pm$ 5	93 $\pm$ 20
don 7	M	0.751	100 $\pm$ 4	94 $\pm$ 3	97 $\pm$ 3	87 $\pm$ 2

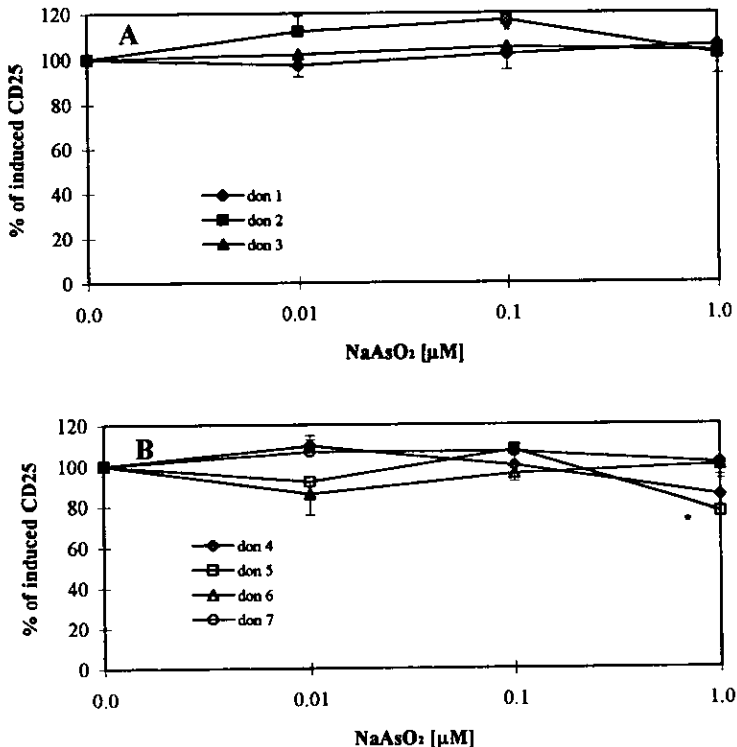
X $\pm$ sd; data represents average of 3 different experiments in triplicate with standard deviation.  
<sub>1</sub> F; female, M; male. <sub>2</sub> Optical density value of formazan production in control cultures, (n=9).

### No effects found in cell viability

The inhibition of proliferation, as measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation, by 1  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> was not due to direct cytotoxicity, since cell viability was maintained between 90 and 100%, as determined by the MTT assay (Table 2).

### Determination of CD25 expression

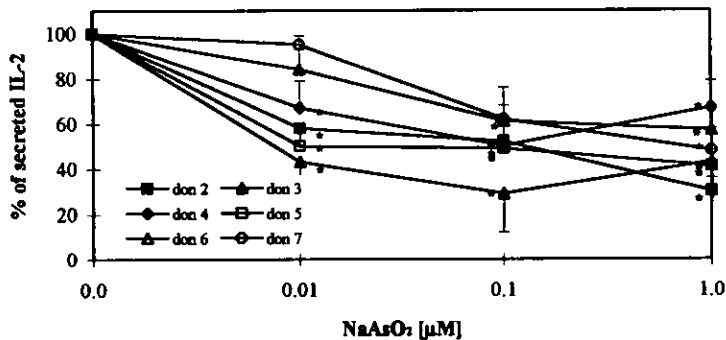
Since expression of CD25 during activation of T lymphocytes, as well as secretion of IL-2, are key events for T-cell proliferation (Smith, 1989), both parameters were evaluated in arsenic-treated lymphocyte cultures (Figure 2). The number of PHA-stimulated PBMC expressing CD25 did not show any significant change in treated and untreated cells (Figure 2A, and 2B). The changes observed on the IL-2 secretion were not reflected in the CD25 expression.



**FIGURE 2.** CD25 (IL-2 receptor) expression on human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite (same treatment as in figure 1). **A)** donors 1 to 3. Mean % of positive cells in control values were: 50, 52, and 62% respectively. **B)** donors 4 to 7. Mean % of positive cells in control values were: 72, 69, 73, and 63% respectively (\* $p < 0.05$ ), data represents average of 3 different experiments in duplicate with standard deviation ( $n = 6$ ).

### Quantification of IL-2 secretion

IL-2 secretion was inhibited in 6 donors at almost all concentrations tested (Figure 3). Donor 1 did not show any change in IL-2 secretion. These data suggest that NaAsO<sub>2</sub> is interfering only with the production or secretion of IL-2 after activation by PHA, and further suggest that inhibition of proliferation, as measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation (Figure 1) could be explained, at least in part, by lower levels of IL-2 in the supernatant.



**FIGURE 3.** IL-2 secretion of human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite (same treatment as in figure 1). Mean U/ml of IL-2 in control values were: 75, 50, 97, 21, 73, and 50 U/ml for donors 2 to 7, where a significant decrease was observed (\* $p < 0.05$ ), data represents average of 3 different experiments in triplicate with standard deviation ( $n=9$ ).

### Recovery of cell proliferation with added hrIL-2

To determine if the [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation inhibition was due to suboptimal IL-2 secretion by the activated lymphocytes, PBMC, from donors 2 to 7 were treated for 24 hr with 1 µM NaAsO<sub>2</sub> and then activated with PHA in the presence of different concentrations of hrIL-2. Donor 1 was not used since it did not show any decrease in IL-2 secretion. As can be seen in figure 4, the addition of IL-2 to the lymphocyte cultures reversed, in a concentration-dependent fashion, the inhibitory effect of arsenic on [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation; the presence of 20 U/ml of hrIL-2, was required to restore [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation in treated cells to levels similar to that in control lymphocyte cultures.

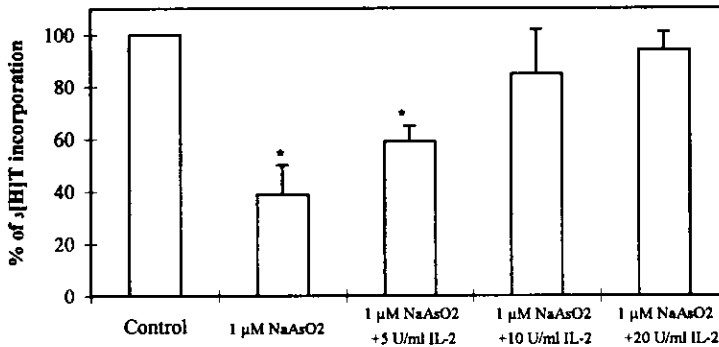
These data indicate that the decrease in cell proliferation observed with arsenic treatment can be reestablished with the addition of hrIL-2, and that the arsenic-treated cells are able to proliferate normally in the presence of optimal concentrations of IL-2.

### Changes in cellular ultrastructure

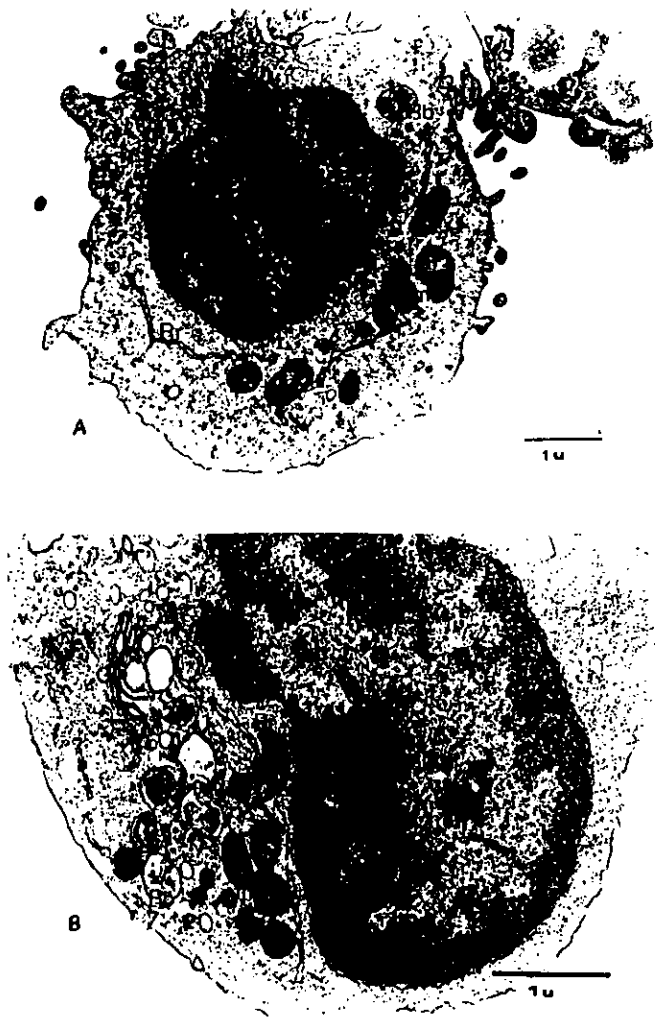
It has been reported that cytokine production in activated cells results in specific changes in the Golgi apparatus (Agren et al., 1996). When arsenic-treated non activated lymphocytes were compared with untreated cells by electron microscopy analysis, it was observed that cellular ultrastructure is appreciably altered (Figure 5).

Control non-activated lymphocytes (Figure 5A) had rounded nuclei with some mitochondria, and few strands of rough endoplasmic reticulum. In cells treated with  $\text{NaAsO}_2$  (Figure 5B), an increase was observed in the size of the Golgi apparatus with several dilated vesicles and the presence of some peroxisomes, the mitochondria were increased, and the cells showed structural damage and reduction of the internal membranes that form the mitochondrion crests. An increase in vesicles was evident, and some residual bodies were also present.

Additional ultrastructural modifications were observed in stimulated lymphocytes (Figure 6). In control stimulated cells (Figure 6A), the distribution of chromatin differed from treated cells, few small mitochondrion and some vacuoles were observed. In the arsenic-treated cells (Figure 6B, and 6C), the nuclei showed indentations, some aggregates of microtubules, and residual and phagocyte bodies were present.



**FIGURE 4.** Recovery of cell  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation by the addition of human recombinant IL-2. The cells were treated as indicated in figure 1, and different concentrations of hrIL-2 were added 24 h after stimulation. Mean of 6 different donor cultures in triplicate (n=18).



**FIGURE 5.** Electron microscopy of resting PBLs treated *in vitro* with sodium arsenite ( $0.01 \mu\text{M}$ ). **A)** Control lymphocyte (23800 X). **B)** Treated lymphocyte (18200 X). An increase in the size of the Golgi apparatus with several dilated vesicles, and damaged mitochondrion were observed in treated cells. RR: rough endoplasmic reticulum, RB: residual bodies, m: mitochondrion, G: Golgi's cistern.



**FIGURE 6.** Electron microscopy of activated PBLs treated *in vitro* with sodium arsenite (0.01  $\mu$ M). **A)** Control cell (18200 X). **B and C)** Treated cells (31200 X). Nuclei indentations, aggregates of microtubules, and residual and phagocyte bodies were present in treated cells. m: mitochondrion, v: vesicles, RB: residual bodies, arrows: nuclear indentations, T: microtubules.



## DISCUSSION

It has previously been shown that arsenic treatment of human lymphocytes *in vitro* impaired activation and proliferation of T lymphocytes when determined by labeling (LI), mitotic (MI), and replication indexes (RI) (Gonsebatt et al., 1992). As a first step to elucidate the mechanism of these alterations, key events were examined in the T-cell activation and proliferation process: the percent of secreted IL-2 and the expression of its receptor (CD25).

Activation of normal T lymphocytes by PHA induces expression of CD25 molecule by more than 100 fold, and IL-2 secretion by more than 50 fold (Smith, 1989). Treatment of lymphocytes with NaAsO<sub>2</sub>, at 1 μM, was found to reduce the proliferative response to PHA when measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. These data confirm our previous observations that arsenic treatment reduces PHA-induced incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU), into lymphocyte nuclei at 36 hr post-stimulation, and that a lower proportion of lymphocytes can successfully complete the cell cycle, as determined by mitotic, and replication indexes (Gonsebatt et al., 1992). It can be argued that the inhibition of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation may be due to a direct cytotoxic effect of NaAsO<sub>2</sub>, however, the concentrations tested in this study did not affect cell viability and this suggests that the observed effect is due to a cytostatic effect (cell cycle arrest), rather to a direct toxicity (cell death).

It has been reported that, under certain conditions (depending on the pattern of cell activation), IL-2 secretion can be induced without increasing CD25 expression, and vice versa (Weiss and Imboden, 1987). This could indicate that NaAsO<sub>2</sub> is interfering only with some part of the cell activation pathways, since CD25 expression was not greatly affected in most donors. It is interesting to note that mercuric compounds can inhibit T cell proliferation *in vitro*, by reducing IL-2 secretion, and altering CD25 expression, without affecting other early markers of T cell activation (such as CD69 expression). These data indicate that mercuric compounds may not alter the initial state of T cell activation but are interfering with specific processes later in the activation pathway (Shenker et al., 1992).

Arsenite has the capacity to bind to critical sulphhydryl groups, and to react primarily with thiol groups of cellular proteins (Squibb and Fowler, 1983). One disulphide bond, between residues 58 and 105, is present in the IL-2 molecule, which is critical for its three-dimensional conformation, and biologic activity (Smith, 1989). It has been reported that the reduction of this disulphide bond abolishes the IL-2 biological activity (Yamada et al., 1987). It is possible that normal levels of IL-2 were secreted by treated cells, but the presence of the metalloid in the culture medium could inactivate the lymphokine. To standardize the CTLL-2 assay, cells were previously treated with low concentration of NaAsO<sub>2</sub>, and no effect was found on the [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation by CTLL-2 cells in culture when hrIL-2 was added, indicating that all the IL-2 added to the cultures were recovered in this assay.

Arsenic shares with heavy metals the capacity to bound to sulphhydryl groups, and as a consequence, to interfere with many properties and functions on normal cells. Arsenic can produce ultrastructural alterations in human lymphocytes, even in a resting state, that are related to dysfunctions of the cytoskeleton (Yamashina, 1995). It has been reported that NaAsO<sub>2</sub> can

interfere with microtubule assembly (Ramírez et al., 1997) and cytoskeleton stability, since it has a colchicine-like effect, and can produce mitotic arrest (Vega et al., 1995). Perturbation of the transport of exportable proteins appears to be the major effect of the structural disorganization of the lamellated structure of the Golgi apparatus, that is maintained by the cytoskeleton (Yamashina, 1995).

It has been reported that cytokine production on activated cells tend to produce specific changes in the Golgi apparatus (Agren et al., 1996; Björk et al., 1996), and that the addition of brefeldin A (a macrocyclic lactone), inhibits secretion of biologically active interleukins by altering the Golgi apparatus, and thus, causing an intracellular accumulation of these proteins (Kuhnle et al., 1996). The cytoskeleton is also related to the movement of exporting vesicles (Alberts et al., 1994; Stinchcombe et al., 1995). A possible explanation for the reduction in IL-2 secretion could be that IL-2 transport, within the cell, is impaired, and the lymphokine would be accumulated in the Golgi apparatus, or in the transport vesicles since cytoskeleton alterations were observed in As treated lymphocytes, that are evidence of cell transport inhibition. These data indicate that microtubules and cytoskeleton are non-functional, and that protein transport within the cell could be inhibited since many vesicles and residual bodies are accumulated in the treated cells. It has also been shown that arsenic has a colchicine-like effect since it is able to alter tubuline polymerization, and thus, block microtubule assembly. Brefeldin A may affect Golgi-specific coat proteins that are involved in regulating membrane transport (Hunziker et al., 1992).

Differences in individual susceptibility to NaAsO<sub>2</sub> treatment were observed among the donors tested in this study; It has been reported that the potential sources of this variability in markers of immunotoxicity and interindividual immune responses can be the result of differences in genetic background, environmental influences, age, nutritional and healthy status (Beswick et al., 1995). Most of these parameters can not be controlled in an *in vitro* study, since they depend on the donor characteristics. However, *in vitro* studies do demonstrate some of this heterogeneity. The stimulatory effect of low concentrations of As on cell proliferation has also been recently reported in primary cultures of normal human keratinocytes obtained from female breast tissue, suggesting that it may be a sex-related effect (Germolec et al., 1996).

There are some other reports that indicate that these differences in susceptibility are common when dealing with toxic, mutagenic, or other acting xenobiotics in humans (Ostrosky-Wegman et al., 1986; Wiencke and Yager., 1992; Elizondo et al., 1994). Studies with metronidazole (Elizondo et al., 1994), have shown that different immunological effects can be produced among donors. These effects can be related to differences in the metabolic and detoxification rate of the individual cell tissues, or to synergistic effects between the xenobiotic tested (such as As) and additional substances that might be present due to a previous exposure.

Methylation is considered the detoxification pathway for As. Humans methylate inorganic As to the more readily excreted and less toxic metabolites methylarsonic acid (MMA 10-20%), and dimethylarsinic acid (DMA 60-80%). Methylation efficiency varies with methionine concentration, and methyltransferases activity (Vahter et al., 1995). However, very little is known with respect to genetic polymorphism on the enzymes involved on the methylation and detoxification of As (Offergelt et al., 1992; Yamauchi et al., 1992; Hopenhayn et al., 1996). It is

evident that As can produce different effects on a variety of cells, and it is possible that some other events could be also altered in the activation process of T cells, or in other cell subpopulations.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors express their gratitude to Drs. Dori Germolec and Patrick O'Neil for their critical review of this manuscript, and thanks Silvia Antuna, Adrián Rondan, Alonso Rondan, and Francisco Pasos for their technical assistance in processing the electron micrographs. This work was partially supported by PADEP, grant 30358.

## REFERENCES

- Agren, K., Andersson, U., Litton, M., Funa, K., Nordlander, B., and Andersson, J. 1996. The production of immunoregulatory cytokines is localized to the extrafollicular area of human tonsils. *Acta Otolaryngol. Stockh.* 116; 477-485.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland, New York.
- Beswick, P., Braunen, P., and Hurles, S. 1995. The effects of smoking and zinc on the oxidative reactions of human neutrophils. *J. Clin. Lab. Immunol.* 21; 71-75.
- Björk, L., Fehniger, T., Andersson, U., and Andersson, J. 1996. Computerized assessment of production of multiple human cytokines at the single-cell level using image analysis. *J. Leukoc. Biol.* 59; 287-295.
- Börzönyi, M., Bereczy, A., Rudnai, P., Csanady, M., and Hornath, A. 1992. Epidemiological studies on human subjects exposed to arsenic in drinking water in Southeast Hungary. *Arch.Toxicol.* 66; 77-78.
- Burns, L.A., and Munson, A.E. 1993. Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD25 (IL-2R/p55). *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 265; 178-186.
- Burns, L.A., Sikorsky, E.E., Saady, J.J., and Munson, A.E. 1991. Evidence for arsenic as the immunosuppressive component of gallium arsenide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110; 157-169.
- Chen, C., and Wang, C. 1990. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res.* 50; 5470-5474.
- Elizondo, G., Montero, R., Herrera, J., Hong, E., and Ostrosky-Wegman, P. 1994. Lymphocyte proliferation kinetics and sister chromatid-exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mutat. Res.* 305; 133-137.
- Gainer, J., and Pry, T. 1972. Effects of arsenicals on viral infections in mice. *Am. J. Vet. Res.* 33; 2299-2305.
- Germolec, D.R., Yoshida, T., Gaido, K., Wilmer, J.L., Simeonova, P.P., Kayama, F., Burleson, F., Dong, W., Lange, R.W., and Luster, M.I. 1996. Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141; 308-318.
- Gillis, S., Ferm, M., Ou, W., and Smith, K. 1978. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* 120; 2027-2032.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Herrera, L., Montero, R., Rojas, E., Cebrián, M.E., and Ostrosky-Wegman, P. 1992. Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat. Res.* 283; 91-95.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Montero, R., García, G., Del Razo, L., Albores, A., Cebrián, M., and Ostrosky-Wegman, P. 1994. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat. Res.* 313; 293-299.
- Hopenhayn, R., Biggs, M., Smith, A., Kalman, D., and Moore, L. 1996. Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.* 104; 620-628.
- Hunziker, W., Whitney, J., and Mellman, I. 1992. Brefeldin A and the endocytic pathway. Possible implications for membrane traffic and sorting. *FEBS Lett.* 307; 93-96.
- Kuhnle, G., Collins, R., Scott, J., and Keil, G. 1996. Bovine interleukins 2 and 4 expressed in recombinant bovine herpesvirus 1 are biologically active secreted glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 77; 2231-2240.
- International Agency for Research on Cancer. 1980. *Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Lyon, France, 23.
- Nordenson, I., and Beckman, L. 1982. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. *Hereditas* 96; 175-181.
- Offergelt, J., Roels, H., Buchet J., Boeckx, M., and Lauwerys, R. 1992. Relation between airborne arsenic trioxide and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites. *Br. J. Ind. Med.* 49; 387-392.
- Okui, T., and Fujiwara, Y. 1986. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 172; 69-76.
- Ostrosky-Wegman, P., García, G., Montero, R., Pérez, B., Alvarez, R., and Cortinas, C. 1986. Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes exposed in vitro and in vivo. *Mutat. Res.* 173; 81-87.
- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M. E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., García, G., Del Razo, L. M., and Cebrián, M. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat Res.* 250; 477-482.

- Ramírez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P., and Ostrosky-Wegman, P. 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 386; 291-298.
- Shenker, B., Rooney, C., Vitale, L., and Shapiro, I. 1992. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 14; 539-553.
- Sikorsky, E.E., Mc Cay, J.A., White, K.L., Bradly, S.G., and Munson A.E. 1989. Immunotoxicity of the semiconductor gallium arsenide in female B6C3F 1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13; 843-858.
- Smith, K. 1989. The interleukin 2 receptor. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5; 397-425.
- Squibb, K.S., and Fowler, B.A. 1983. The toxicity of arsenic and its compounds. In *Biological and Environmental Effects of Arsenic* (B. Fowler, Ed.) pp. 233-269. Elsevier Science Publishers, New York.
- Stinchcombe, J.C., Nomoto, H., Culter, D.F., and Hopkins, C.R. 1995. Anterograde and retrograde traffic between the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 131; 1387-1401.
- Vahter, M., Concha, G., Nermell, B., Nilsson, R., Dulout, F., and Natarajan, A. 1995. A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. *Eur. J. Pharmacol.* 293; 455-462.
- Vega, L., Gonsebatt, M.E., and Ostrosky-Wegman, P. 1995. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutat. Res.* 334; 365-373.
- Wan, B., Christian, R., and Sokup, S. 1982. Studies of cytogenetic effects of sodium arsenicals on mammalian cells in vitro. *Environ. Mut.* 4; 493-498.
- Weiss, A., and Imboden, J. 1987. Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* 41; 1-38.
- Wiencke, J., and Yager, J. 1992. Specificity of arsenite on potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environ. Mol. Mutagen.* 19; 195-200.
- Yamada, T., Fujishima, A., Kawahara, K., Kato, K., and Nishimura, O. 1987. Importance of disulfide linkage for constructing the biological active human interleukin-2. *Arch. Biochem. Biophys.* 257; 194-199.
- Yamashina, S. 1995. Dynamic structure and function of Golgi apparatus in the salivary acinar cells. *J. Electron. Microsc.* 44; 124-130.
- Yamauchi, H., Takahashi, K., Mashiko, M., Saitoh, J., and Yamamura, Y. 1992. Intake of different chemical species of dietary arsenic by Japanese, and their blood and urinary arsenic levels. *Appl. Organomet. Chem.* 6; 383-394.
- Zelikoff, J.T., Smialowicz, R., Bigazzi, P.E., Goyer, R.A., Lawrence, D.A., Maibach, H.I., and Gardner, D. 1994. Immunomodulation by metals. *Fundam. Appl. Toxicol.* 22; 1-7.

## **THE IMMUNOSUPPRESSANT EFFECT OF SODIUM ARSENITE ON HUMAN LYMPHOCYTES *IN VITRO*. II. INHIBITION OF IL-2 PROTEIN SECRETION.**

**Libia Vega,**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Genética Toxicológica, UNAM, México, D.F. México.

**Cinthya Díaz, Vicente Madrid,**  
Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

**Rafael Saavedra,**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología, UNAM, México, D.F. México.

**and Patricia Ostrosky-Wegman.**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Genética Toxicológica, UNAM, México, D.F. México.

### **INHIBITION OF IL-2 SECRETION BY SODIUM ARSENITE**

Address to correspondence to P. Ostrosky-Wegman, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Depto. Genética Toxicológica, UNAM, Circuito Escolar Interior, Apdo. Postal 70228, C.P. 04510, México D.F., México. Fax: (52-5) 622-3365. E-mail: [ostrosky@servidor.unam.mx](mailto:ostrosky@servidor.unam.mx)

### **ABSTRACT**

Previous studies suggest that As exposure leads to a diminution of phytohemagglutinin (PHA) stimulated T cell Interleukin-2 (IL-2) secretion in human lymphocytes treated *in vitro*. In order to understand the mechanism of this suppression, we evaluated the effect of As on the expression of IL-2 gene, the secretion of the IL-2 protein and the intracellular IL-2 levels in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). As we have previously reported, the inhibition of IL-2 secretion, by *in vitro* treated lymphocytes from approximately 50 to 100%, was observed in all donors. The IL-2 secretion was determined by a biologic assay using a cell line dependent on IL-2 (CTLL-2). The cell proliferation induced by PHA was also inhibited but not in the same way as IL-2 secretion. The determination of the mRNA of IL-2 and the intracellular IL-2 levels demonstrated that the inhibition is not at the transcriptional level, but at the intracellular transport and secretion of this protein. These data indicates that sodium arsenite is inhibiting the extracellular transport of this protein, may be due to its capacity to interfere with tubuline assembly and to alter cytoskeleton ultrastructure, which is the responsible of the correct transport of vesicles within the cell.

## INTRODUCTION

Arsenic (As) is a common metalloid which contaminates drinking water in several regions of the world; chronic exposure is associated with skin, lung, bladder, and kidney cancer (Chen and Wang, 1990; Börzönyi et al., 1992).

Previous studies suggest that As exposure leads to a diminution of PHA stimulated T cell proliferation in humans (Ostrosky-Wegman et al., 1991; Gonsebatt et al., 1994), as well as in human lymphocytes treated *in vitro* (Gonsebatt et al., 1992). It has been reported that exposure to sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ) *in vitro*, can reduce IL-2 secretion by human lymphocytes (Vega et al., 1997), and that it can produce cellular structural changes that are associated to disfunction of the cytoskeleton (Vega et al., 1995; Ramirez et al., 1997), and so, interfere with the intracellular transport of exportable proteins, that requires a totally functional cytoskeleton since the movement of vesicles from the Golgi Apparatus to the cell membrane is regulated by the cytoskeleton net (Yamashina, 1995).

In order to understand the mechanism of action by which As induces a diminution of IL-2 secretion in stimulated T cells, we evaluated the effect of  $\text{NaAsO}_2$  on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro* on the expression of messenger RNA (mRNA) and secretion of Interleukin-2 (IL-2), which are primary events in the activation and proliferation of T cells.

## METHODS

### Subjects

Blood donors were laboratory staff members, 30-38 years old (3 males and 2 females), which had not been taken any drug for at least one month before sampling, and who had no medical history of immune-mediated diseases. PBMC were isolated by density centrifugation using Ficoll-Hypaque (Sigma), and washed twice with fresh RPMI 1640 medium (Sigma); autologous plasma was used for each donor culture.

### Culture media

All reagents were obtained from Sigma. PBMC were cultured in RPMI 1640 supplemented with L-glutamine (2 mM), non-essential amino acids (10 mM), and 10% autologous plasma (complete medium). CTLL-2 cells (mouse cytotoxic T lymphocytes dependent on IL-2) were maintained in RPMI 1640 media supplemented with L-glutamine, non-essential amino acids, 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco), and 2 international units of human recombinant IL-2/ml (hrIL-2) (Boehringer).

### Cell culture

PBMC were resuspended at  $10^6$  cells/ml in complete medium (supplemented with autologous plasma), one million cells per well were seeded on a 24-well cell culture plate (Costar), and incubated at 37 °C, and 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified atmosphere;  $\text{NaAsO}_2$  (0.01, 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  in distilled water) was added directly to the cell cultures; after 24 h lymphocytes were activated with PHA (GIBCO) (2  $\mu\text{g/ml}$ ), and incubated for an additional 24, 48, or 72 h. Supernatants of these primary cultures (500  $\mu\text{l/well}$ ) were taken 24 or 48 h after activation to measure secreted IL-2.

Parallel cultures were maintained in 96-well culture plates for proliferation determination (see below).

#### **Cell Proliferation.**

Two hundred thousand cells per well were incubated (in triplicate) in 96-well culture plates in a total volume of 200  $\mu$ l for 24, 48 or 72 h, under the same conditions described above. Cells were pulsed with 1  $\mu$ Ci of [ $^3$ H]-thymidine (Du Pont) for the last 18-20 h, and were harvested onto glass-fiber filters by an automatic cell harvester (Skatron). [ $^3$ H]-thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation spectroscopy on a Betaplate counter (Wallac) to determine cellular response to PHA.

#### **Secreted IL-2 determination**

Secreted IL-2 by control and treated cell cultures was determined using the CTLL-2 cell assay as described by Gillis et al. (1978); ten thousand CTLL-2 cells were incubated in a total volume of 200  $\mu$ l of culture medium containing dilutions (1:5, 1:10, and 1:20) of the lymphocyte culture supernatants (primary culture), or dilutions of hr IL-2, for 48 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were pulsed with 0.5  $\mu$ Ci of [ $^3$ H]-thymidine for the last 12-18 h and were harvested onto glass-fiber filters; [ $^3$ H]-thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation spectroscopy. Results were compared with those obtained using the IL-2 standard and units of IL-2/ml were calculated. No residual NaAsO<sub>2</sub> effect was observed directly on the CTLL-2 cells (data not shown) on cell proliferation at the concentrations used in this study.

#### **Intracellular IL-2 determination**

Cultures of human lymphocytes treated with sodium arsenite were harvested and washed with fresh RPMI medium, and aliquoted at 1X10<sup>6</sup> cells/ml, cells were frozen at -20° C and then defrosted at 36° C three times. Supernatants were recovered and used in the CTLL-2 assay to determine intracellular IL-2 under the same conditions above. The control curve of hrIL-2 was performed with hrIL-2 treated under the same conditions than the human lymphocytes.

#### **Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of IL-2 gene expression.**

Total RNA was isolated from human lymphocytes treated *in vitro* with NaAsO<sub>2</sub> for 24 h and activated with PHA for an additional 48 h. Total RNA was isolated using the reagent Trizol (Gibco BRL), based on the technique previously described (Chomczynski, 1993). Reverse transcription was performed at 37 °C for 1 h using 6  $\mu$ g of total RNA obtained from the human lymphocytes in dH<sub>2</sub>O-DEPC, 4  $\mu$ l of PBS (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ l DTT 100 mM, 1  $\mu$ l (40 U) RNAsin (Promega), 2  $\mu$ l dNTP mix (10 mM each of the four deoxyribonucleotide triphosphates), 1  $\mu$ l Oligo d(T 12-18) (USB Corp.) and 1  $\mu$ l (200 U) Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Gibco BRL).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out as described by Pietsch et al (1994) with minor modifications. Briefly, after initial denaturation at 94 °C for 1 min, there followed annealing at 60 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min, for 30-40 cycles. The probes sequence used were: Interleukin-2; 5'-ATGTACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTCA-3', and 5'AGTCAAATCCAGAACATGCCGCAGA GGTCCA-3', and the constitutive



G3DPH gene were; 5'-ACCACAGTCCATGCCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGC TGT-3' (450 bp). After polyacrylamide gel electrophoresis and Southern transfer, membranes were hybridized with the appropriate oligonucleotide probe using a non-radioactive system (Amersham) and analysed by an image densitometer (Bio-Rad) couple to a computer program (Molecular Analyst 1.4).

#### **Statistical analysis.**

A Student's "t" test was used to determinate the significance of results and a heterogeneous chi-square test was used to determinate the homogeneity of the data obtained from all donors, data were considered significant different from control when  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Treatment**

The effect of As on human PBMC treated *in vitro* was evaluated by incubation of the cells for 24 h with three different concentrations of  $\text{NaAsO}_2$  (0.01, 0.1 and 1  $\mu\text{M}$ ), followed by activation with PHA for 24, 48 or 72 h. These cells were harvested and the [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation, the IL-2 secretion and the IL-2 gene expression (by mRNA determination) were evaluated.

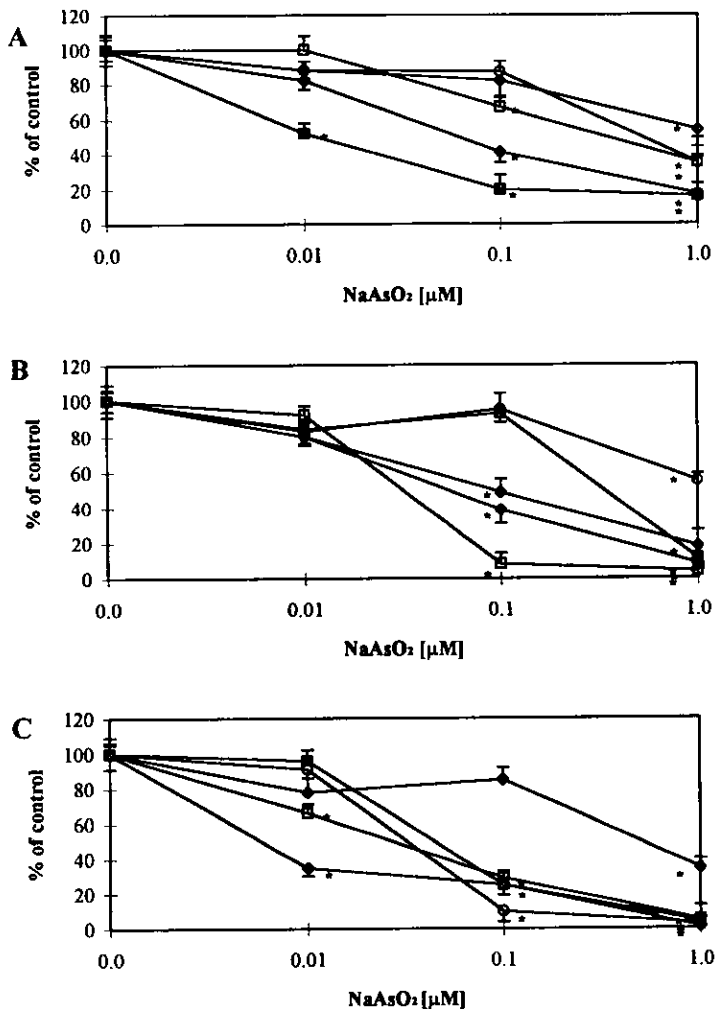
### **Cell proliferation**

The cell proliferation (as measured by [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation), was evaluated at the three different times of harvest, as can be seen in figure 1, and inhibition of cell proliferation, was observed in all donors with the highest dose tested (1  $\mu\text{M}$ ). The two female donors (shaded figures) had a greater inhibition of cell proliferation at 24 h of culture than lymphocytes from male donors (blank figures) at the same time of harvest (figure 1A), although this difference was not maintained through the latest periods of culture (figure 1B and C).

It is evident that the inhibition of cell proliferation is increased as the time of culture is augmented, and that there are individual differences in the effects produced by As in these donors, since different behaviors were observed among them. However, when all the individuals data were taken together as a mean, it can be observed that an inhibition trend is present, even when the mean is not statistically significant, and that the maximal inhibition was observed at 72 h of culture (table 1).

### **IL-2 secretion**

When the IL-2 secretion was determined, a decrease of approximately 50% on IL-2 production was observed when IL-2 was measured at 24 h of culture (figure 2A), except for donor 1, who did not show any significant change in IL-2 levels. However, in this donor the reduction of IL-2 secretion was maximal when measured at 48 h of culture (figure 2B). When taken together, the mean data indicates that there is a significant inhibition of IL-2 secretion even with the lowest dose tested at 48 h of culture, and from 0.1  $\mu\text{M}$  at 24 h of culture (table 2).

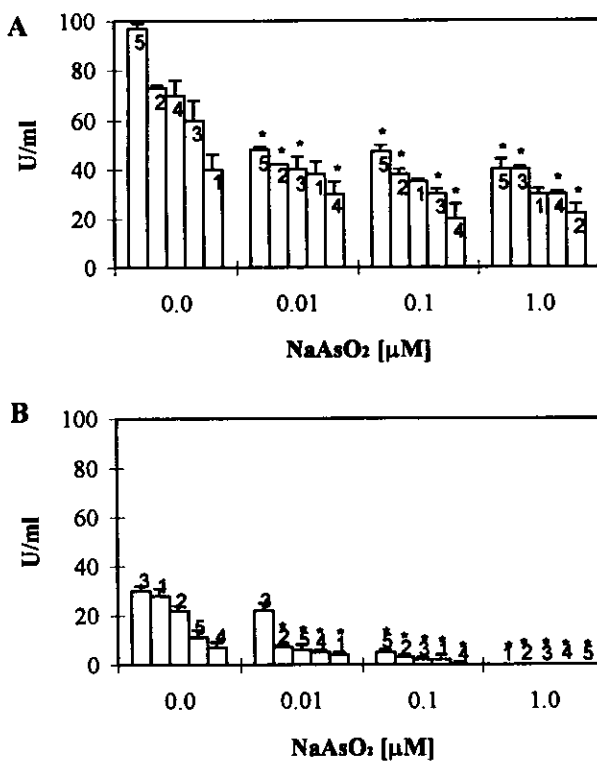


**FIGURE 1.** Cell proliferation in human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite for 24 h, and stimulated with PHA, percent related to control values. Female donors; 1 (◆) and 2 (■), male donors; 3 (♠), 4 (□) and 5 (○). **A)** Harvest at 24 h of culture. Mean control values were 13090, 5720, 1811, 6770, and 7720 cpm respectively. **B)** Harvest at 48 h of culture. Mean control values were: 90134, 16546, 47529, 75200 and 36326 cpm respectively. **C)** Harvest at 72 h of culture. Mean control values were: 325910, 54005, 16112, 81022 and 74220 cpm respectively. \*significant different from control ( $p < 0.05$ ) Student's "t" test.

**TABLE 1. Cell proliferation in human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite. Percent of cpm related to control value.**

NaAsO <sub>2</sub> [ $\mu$ M]	24 h	48 h	72 h
Control	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 6	100 $\pm$ 9
0.01	82 $\pm$ 18	84 $\pm$ 4	73 $\pm$ 24
0.1	59 $\pm$ 28	57 $\pm$ 37	35 $\pm$ 28*
1	31 $\pm$ 15*	19 $\pm$ 20*	10 $\pm$ 14*

Mean of 5 individuals by triplicate  $\pm$  S.D. \*significant different from control  $p < 0.05$  Student "t"



**FIGURE 2. IL-2 secretion of human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite for 24 h, and stimulated with PHA. Female donors 1 and 2, male donors 3, 4 and 5. A) Harvest at 24 h of culture. B) Harvest at 48 h of culture. \*significant different from control ( $p < 0.05$ ) Student's "t" test.**

**TABLE 2. IL-2 secretion in human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite. Percent of U/ml related to control value.**

NaAsO <sub>2</sub> [μM]	24 h	48 h
Control	100±7	100±5
0.01	63±20	49±25*
0.1	53±21*	15±17*
1	51±18*	0±0*

Mean of 5 individuals by triplicate ± S.D. \*significant different from control p<0.05 Student "t"

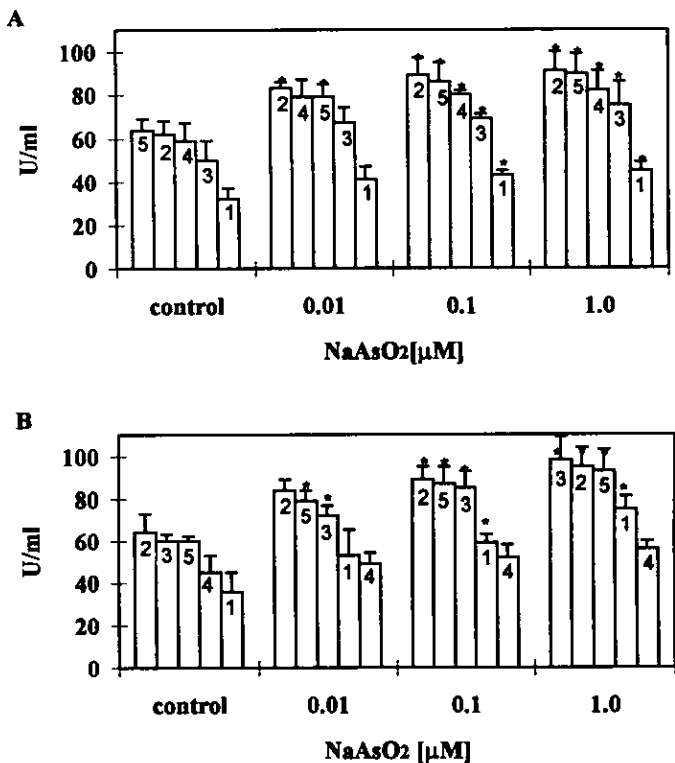
### **Intracellular IL-2**

When the intracellular IL-2 was determined we observed that the treated cells showed higher levels of intracellular IL-2 than non treated cells (figure 3). Although the proportion of the increase on the intracellular IL-2 levels were not directly correlated to the proportion of the decrease of secreted IL-2 for all individuals (table 3).

**TABLE 3. Intracellular IL-2 on human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite. Percent of U/ml related to control value.**

NaAsO <sub>2</sub> [μM]	24h	48h
Control	100±8	100±12
0.01	131±5*	128±13*
0.1	137±4*	141±14*
1	144±5*	160±26*

Mean of 5 individuals by triplicate ± S.D. \*significant different from control p<0.05 Student "t"



**FIGURE 3.** Intracellular IL-2 determination of human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite for 24 h, and stimulated with PHA, using the CTLL-2 assay. Supernatants of human lymphocytes were recovered after a frost and defrost treatment. \*significant different from control ( $p < 0.05$ ) Student's "t" test.

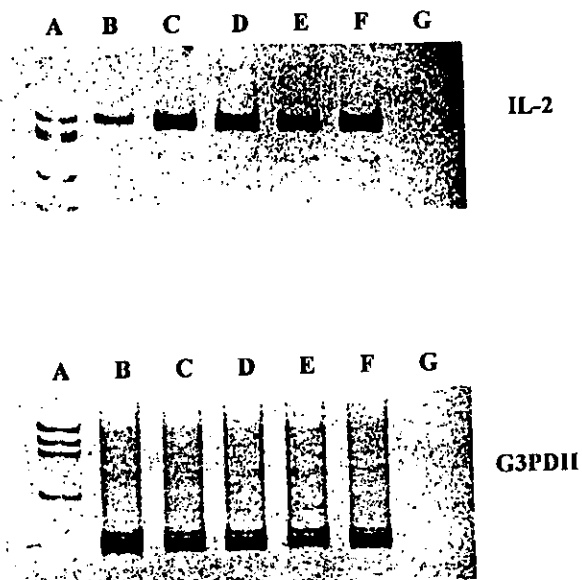
### IL-2 mRNA quantification

To determine if this inhibition of IL-2 secretion was also at the transcriptional level we evaluated IL-2 gene expression by determination of the mRNA of IL-2 gene (figure 4). When these data were evaluated as a mean of all individuals (table 4), no significant statistical differences were found in the transcription of this gene or in the gene used as a control (G3PDH), but when data were analysed separately for each individual (figure 5), we could detect the inhibition of mRNA of IL-2 gene in one of the individuals, donor 4, who showed the maximal inhibition of cell proliferation at 48 h (figure 1B), and the greater inhibition of IL-2 secretion at 24 h (figure 2A).

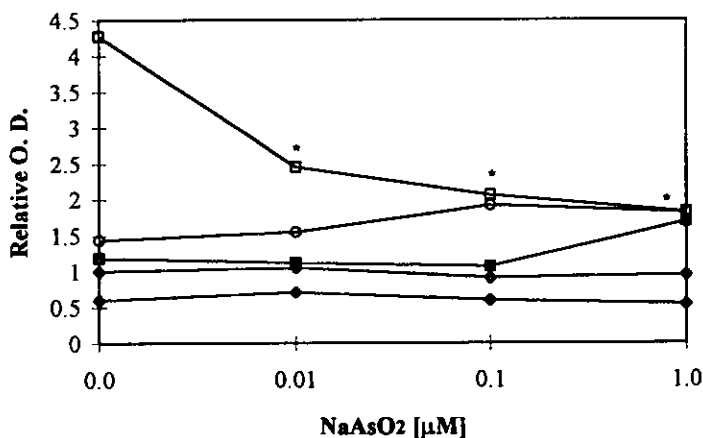
**TABLE 4. mRNA determination in human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite. Percent of units of optical density related to control value.**

NaAsO <sub>2</sub> [ $\mu$ M]	IL-2	G3PDH
Control	100 $\pm$ 12	100 $\pm$ 19
0.01	90 $\pm$ 18	97 $\pm$ 29
0.1	91 $\pm$ 11	108 $\pm$ 39
1	62 $\pm$ 35	87 $\pm$ 44

Mean of 5 individuals  $\pm$  S.D.



**FIGURE 4.** mRNA determination on human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite for 24 h, and stimulated with PHA. Harvest at 48 h of culture. **A:** molecular weigh markers; **B:** non-stimulated, non-treated cells; **C:** activated non-treated cells; **D:** 0.01  $\mu$ M sodium arsenite; **E:** 0.1  $\mu$ M sodium arsenite; **F:** 1  $\mu$ M sodium arsenite; **G:** negative control (distilled water).



**FIGURE 5.** Relative optical density of IL-2mRNA corrected by G3PDH values of human lymphocytes treated *in vitro* with sodium arsenite for 24 h, and stimulated with PHA. Female donors; 1 (◆) and 2 (■), male donors; 3 (◇), 4 (□) and 5 (○). Mean control values for G3PDH were: 6.04, 3.34, 2.78, 1.26 and 3.60 units of O. D. respectively. Mean control values for IL-2 were: 3.61, 3.98, 2.79, 5.38 and 5.18 units of O. D. respectively. \*significant different from control ( $p < 0.05$ ) Student's "t" test.

## DISCUSSION

It has previously been shown that As treatment of human lymphocytes *in vitro* impaired activation and proliferation of T cells (Gonsebatt et al., 1992), and that it can reduce the IL-2 secretion by activated lymphocytes (Vega et al., 1997). Activation of normal lymphocytes by PHA induces a 50 fold increase of IL-2 secretion and IL-2 gene expression (Smith, 1989).

We found that treatment of human lymphocytes with NaAsO<sub>2</sub> reduces cell proliferation, as well as IL-2 secretion from 50 to 100%, without altering IL-2 gene expression at the transcriptional level. These data suggest that arsenic can be interfering with other cellular mechanisms besides the activation pathways since expression of IL-2 protein is not inhibited, and its receptor is not altered, as we previously reported (Vega et al., 1997). These data confirms our previous report on the possible inhibition of the intracellular transport of exportable proteins, since only the secretion of this protein is inhibited while the gene regulated expression is maintained at normal levels.

Although it has been reported that arsenical compounds can modulate the expression of other genes at the mRNA level, as involucrin, transglutaminase (Kachinskas et al., 1994),  $\text{INF}\gamma$ , IL-6 (Germolec et al., 1996), GM-CSF and  $\text{TGF}\alpha$  (Germolec et al., 1997), we could not demonstrate such effect on IL-2 gene expression in four of the five donors used in this study. However, one of them (donor 4), had a relative decrease of IL-2 mRNA synthesis of approximately 50%. This individual showed the maximal inhibition of cell proliferation at 48 h, and the greater inhibition of IL-2 secretion at 24 h. This could represent, or be related to, the differences in susceptibility to As treatment, and indicate the variability in the individual immune response, since this donor appears to be more susceptible to As effects than the rest of the individuals tested in this study.

These differences on the individual susceptibility have been observed in relation to the response to other xenobiotics (Ostrosky-Wegman et al., 1986; Wiencke and Yager, 1992; Elizondo et al., 1994), and it has been related to differences in metabolism and genetic background of each individual. In the case of the immune system, these differences can be also related to nutritional and health status, as well as age, and smoking and alcoholic habits.



## REFERENCES

- Börzönyi, M., Bereczy, A., Rudnai, P., Csanady, M. and Hornath, A. 1992. Epidemiological studies on human subjects exposed to arsenic in drinking water in Southeast Hungary. *Arch.Toxicol.* 66; 77-78.
- Chen, C. and Wang, C. 1990. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res.* 50; 5470-5474.
- Chomczynski, P. 1993. Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques* 15; 532-538.
- Elizondo, G., Montero, R., Herrera, J., Hong, E., and Ostrosky-Wegman, P. 1994. Lymphocyte proliferation kinetics and sister chromatid-exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mutat. Res.* 305; 133-137.
- Germolec, D.R., Spalding, J., Wilmer, J.L., Yoshida, T., Simeonona, P.P., Kayama, F., Gaido, K., Tennant R., Burleson F., Dong W., Lange R.W. and Luster M.I. 1997. Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors. *Mutat. Res.* 386; 209-218.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Herrera, L.A., Montero, R., Rojas, E., Cebrián, M.E. and Ostrosky-Wegman, P. 1992. Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat. Res.* 283; 91-95.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Montero, R., García, G., Del Razo, L., Albores, A., Cebrián, M. and Ostrosky-Wegman, P. 1994. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat. Res.* 313; 293-299.
- Kachinskas, D., Phillips, M., Qin, Q., Stokes, J. and Rice, R. 1994. Arsenate perturbation of human keratinocyte differentiation. *Cell Growth and Differentiation* 5; 1235-1241.
- Ostrosky-Wegman, P., García, G., Montero, R., Pérez, B., Alvarez, R., and Cortinas, C. 1986. Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes exposed in vitro and in vivo. *Mutat. Res.* 173; 81-87.
- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., García, G., Del Razo, L. M. and Cebrián, M. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat Res.* 250; 477-482.
- Pietsch, K., Ehlers, S. and Jacobs, E. 1994. Cytokine gene expression in the lung of Balb/c mice during primary and secondary intranasal infection with *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* 14; 2043-2049.
- Ramírez, P., Eastmond, D.A., Lacleite, J.P. and Ostrosky-Wegman, P. 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 386; 291-298.
- Smith, K. 1989. The interleukin 2 receptor. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5; 397-425.
- Vega, L., Gonsebatt, M.E. and Ostrosky-Wegman, P. 1995. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutat. Res.* 334; 365-373.
- Vega, L., Ostrosky-Wegman, P., Montes de Oca, P., Fortoul, T.I. and Saavedra, R. 1977. The immunosuppressant effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro. I. Alteration on interleukin-2. *Toxicol Environm. Health* (submitted).
- Wiencke, J., and Yager, J. 1992. Specificity of arsenite on potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environ. Mol. Mutagen.* 19; 195-200.
- Yamashina, S. 1995. Dynamic structure and function of Golgi apparatus in the salivary acinal cells. *J. Electron. Microsc.* 44; 124-130.

## CAPÍTULO IV

### MATERIAL Y MÉTODOS

Adicionales a los experimentos descritos anteriormente en el capítulo III, se realizó la comparación de los efectos del arsenito de sodio sobre la viabilidad y la proliferación celular en otras dos líneas celulares; CTLL-2 (células T citotóxicas de ratón incapaces de producir IL-2 e IL-4) y P3X63.Ag8.653 (línea linfocítica de células B de ratón).

#### Estudios en líneas celulares

Las células CTLL-2 se mantuvieron en cámara húmeda a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, cultivadas en cajas de 75 ml con medio RPMI-1640 (1X10<sup>5</sup> células/ml) suplementado con 2mM de L-glutamina, 10mM de aminoácidos no esenciales y 10% de suero fetal bovino inactivado a 56 °C por 30 min, en presencia de 2 unidades internacionales de IL-2 humana recombinante (IL-2hr) por ml. Las células fueron resembradas cada tercer día en medio fresco, en una dilución 1:10.

Las células P3X63.Ag8.653 se mantuvieron en cámara húmeda a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, cultivadas en cajas de 75 ml con medio DMEM (1X10<sup>5</sup> células/ml) suplementado con 2mM de L-glutamina, 10 mM de aminoácidos no esenciales y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor. Las células fueron resembradas cada tercer día en medio fresco, en una dilución 1:10.

Las células para cultivo individual se resuspendieron a una concentración de 1X10<sup>5</sup> células/ml. Se cultivaron en placas de 96 pozos por triplicado cada vez (tres repeticiones), en un volumen final de 200 µl de medio. Se adicionó arsenito de sodio (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 µM en agua destilada para las células CTLL-2 y 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 y 100.0 µM para las células P3X63.Ag8.653) directamente a los cultivos y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en una cámara húmeda por 24 h. Después de este tiempo las células CTLL-2 fueron suplementadas con 2 U/ml de IL-2hr y las células P3X63.Ag8.653 con 10% de suero fetal bovino inactivado. Se incubaron bajo las mismas condiciones por 24, 48 y 72 h más.

**Viabilidad.** La viabilidad de las células en cultivo se determinó por dos métodos diferentes; por exclusión de azul tripano y por metabolitos de MTT al final del tiempo de cultivo para las dos líneas celulares.

**Exclusión de azul tripano:** Se determinó la proporción de células vivas contando 100 células consecutivas en alícuotas de 1 ml de una solución de azul tripano al 10% con medio de cultivo que contenía 20 µl de células obtenidas del cultivo.

**Metabolitos de MTT:** Se agregaron 20 µl de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT, 5 mg/ml en PBS) a los cultivos de células en placas de 96 pozos y se incubaron por 4 h; se agregaron 100 µl de SDS al 10% en HCl 0.01 N y se determinó la densidad óptica con un lector de ELISA a 590 nm (*Mosmann, 1983*). Los valores de densidad óptica obtenidos en cultivos no tratados se consideraron con el 100% de viabilidad.

**Proliferación celular.** Los dos tipos de células fueron sembrados, en cultivos paralelos ( $1 \times 10^6$  células/ml), en cajas de 96 pozos, se agregó el tratamiento de arsenito de sodio (mismas concentraciones que en el ensayo anterior) y se mantuvieron en cámara húmeda a  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , se les aplicó un pulso de  $1 \mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en las últimas 18-20 h del cultivo. Las células se cosecharon a las 24, 48 y 72 h, en filtros de fibra de vidrio con un cosechador automático y se determinó la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en un lector de radiación beta (Betaplate). Los valores en cpm obtenidos en los cultivos no tratados se consideraron como el 100% de proliferación.

**Controles del ensayo de células CTLL-2.** Para el ensayo de la determinación de la secreción de IL-2 se estudió el efecto residual del arsenito de sodio sobre los cultivos de células CTLL-2. En cultivos de células CTLL-2 tratadas de la misma manera que para los ensayos de proliferación, se agregaron, como tratamiento, diferentes concentraciones de IL-2 (0.01, 0.03, 0.06, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 y 3.0 U/ml), con la máxima concentración de arsenito de sodio que podía estar presentes en el medio condicionado de los linfocitos humanos al momento de hacer las diluciones y ponerlas en contacto con las células CTLL-2 ( $0.02 \mu\text{M}$  de arsenito de sodio). Estas células fueron incubadas por 48 h en cámara húmeda a  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Se aplicó un pulso de  $1 \mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en las últimas 18-20 h del cultivo, se cosecharon en filtros de fibra de vidrio con un cosechador automático y se determinó la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en un lector de radiación beta.

En esta misma serie de experimentos se determinó también el efecto de 3 ciclos de congelación y calentamiento (de  $-20$  a  $37^\circ \text{C}$  por 10 min) sobre la IL-2 agregada a las células CTLL-2. A los cultivos de células CTLL-2 se les agregaron las mismas concentraciones de IL-2 (0.01-3 U/ml) y se incubaron por 48 h. Se cosecharon y analizaron de la misma manera que las células CTLL-2 tratadas con arsenito de sodio. Estas determinaciones se utilizaron como curvas controles para la cuantificación comparativa de los valores de IL-2 obtenidos en los cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio.

### **Estudios en linfocitos humanos**

Además de los parámetros estudiados y mostrados en el capítulo III (proliferación viabilidad, secreción de IL-2, IL-2 intracelular, expresión de la molécula CD25, inducción del ARN mensajero de IL-2 y alteraciones morfológicas de los linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio), se estudió también el efecto del arsenito de sodio sobre las subpoblaciones linfocitarias después del cultivo *in vitro*, en linfocitos humanos.

**Unión antígeno-anticuerpo.** Inicialmente se determinó el efecto del arsenito de sodio sobre la interacción entre anticuerpos monoclonales y sus ligandos específicos.

**Obtención de muestras.** Se extrajo sangre de 2 donadores sanos (1 mujer y 1 hombre) por venopunción con heparina, los linfocitos se separaron por centrifugación en un gradiente de Fycol-hypaque por 30 min a 1600 rpm. Las células se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10 mM de aminoácidos no esenciales y 10 % de suero autólogo. Se prepararon alicuotas de  $1 \times 10^6$  células/ml.

**Tratamiento.** Estas células fueron incubadas en cajas de 24 pozos ( $1 \times 10^6$  células/ml) donde se les aplicó un tratamiento de  $1.0 \mu\text{M}$  de arsenito de sodio por 2 h, a continuación se lavaron las células con medio de cultivo fresco y se determinó la expresión de las moléculas CD3, CD4 y CD8 por inmunofluorescencia, a distintos periodos de recuperación después de haber sido lavadas (0, 5, 10, 15 y 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h), durante el tratamiento y la recuperación, las células se mantuvieron en cámara húmeda a  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

**Inmunofluorescencia.** Los cultivos de linfocitos humanos fueron lavados dos veces con PBS frío suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado y 0.01% de azida de sodio. Un millón de células por muestra se resuspendieron en  $100 \mu\text{l}$  de PBS y se adicionó  $1 \mu\text{g}$  de anticuerpo anti-CD3-FITC/CD4-PE/CD8-PerCP, se incubaron a  $4^\circ \text{C}$  por 1 h en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PBS con 1% de  $\rho$ -formaldehído. Se analizaron 10,000 células por muestra en un citofluorómetro de flujo utilizando el programa Lysys II en el que se analizó también la medio de fluorescencia para cada muestra.

**Determinación de la expresión de marcadores de membrana.** En otra serie de experimentos, y en cultivos paralelos de linfocitos humanos, se determinó el efecto del arsenito de sodio sobre la expresión de los marcadores de membrana CD3, CD4 y CD8 en cultivos de linfocitos obtenidos de 11 donadores sanos (4 mujeres y 6 hombres). Los linfocitos se separaron de la misma manera que en el ensayo anterior.

**Tratamiento.** Los linfocitos humanos se sembraron en cajas de 24 pozos ( $1 \times 10^6$  células/ml), y fueron tratados *in vitro* por 24 h con arsenito de sodio (0.01, 0.1 y  $1.0 \mu\text{M}$ ), a continuación los cultivos se lavaron y se cultivaron por 48 h más en presencia de PHA. Las células se mantuvieron en cámara húmeda a  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

**Inmunofluorescencia.** Después de 48 h los cultivos de linfocitos humanos fueron lavados dos veces con PBS frío suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado y 0.01% de azida de sodio. Un millón de células se resuspendieron en  $100 \mu\text{l}$  de PBS y se adicionó  $1 \mu\text{g}$  de anticuerpo anti-CD3-FITC/CD4-PE/CD8-PerCP, se incubaron a  $4^\circ \text{C}$  por 1 h en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PBS con 1% de  $\rho$ -formaldehído. Se analizaron 10,000 células por muestra en un citofluorómetro de flujo.

### **Estudios en ratones transgénicos**

Se decidió analizar algunos de los parámetros determinados en linfocitos humanos tratados *in vitro* (proliferación y subpoblaciones linfocitarias) en un modelo animal tratado *in vivo* con arsenito de sodio.

**Modelo animal para hidroarsenicismo.** Se utilizaron ratones FVB TC.AG que presentan el promotor de  $\gamma$ -globulina fetal fusionado al gen estructural de  $v$ -Ha-ras, con mutaciones en los codones 12 y 59, y unido a la secuencia 25 de poliadenilación del virus SV40. Estos ratones son altamente susceptibles a desarrollar papilomas cuando se les aplica un promotor carcinogénico como el TPA, y se consideran como un modelo animal iniciado de cáncer de piel.

**Tratamiento.** Los ratones fueron tratados por 4 semanas con arsenito de sodio (0.02%) en el agua de bebida y sacrificados después de este tiempo para obtener el bazo. Como grupo control se utilizaron estos mismos ratones a los que se les suministró agua corriente. Los animales fueron mantenidos bajo estricta vigilancia en bioterio y con libre acceso a agua y alimento.

**Obtención de células.** Después de las 4 semanas de tratamiento se extirpó el bazo de los ratones y se mantuvo en medio RPMI fresco, las células del bazo se extrajeron por filtración y centrifugación. Los botones celulares se lavaron y se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI fresco suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10 mM de aminoácidos no esenciales y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor. Estas células fueron cultivadas en placas de 24 y 96 pozos por 24 h en presencia de PHA, en una cámara húmeda a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

En estos cultivos se determinó la proliferación celular, por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, la expresión del receptor a IL-2 (CD25) y las subpoblaciones linfocitarias presentes en el cultivo (CD3/CD4 y CD3/CD8).

**Proliferación celular.** Los linfocitos de ratón se cultivaron en cajas de 96 pozos ( $1 \times 10^4$  células por pozo) en medio RPMI, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y en presencia de PHA por 24 h. Se mantuvieron en una cámara húmeda a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. A los cultivos de linfocitos de ratón se les aplicó un pulso de 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina en las últimas 18-20 h del cultivo, se cosecharon en filtros de fibra de vidrio con un cosechador automático y se determinó la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en un lector de radiación beta.

**Determinación de las subpoblaciones linfocitarias.** Se determinó la expresión de los marcadores linfocitarios CD3/CD4 y CD3/CD8 además de la inducción de la molécula CD25 en células obtenidas de bazo de ratones testigos y tratados con arsenito de sodio y cultivados por 24 h en presencia de PHA.

**Inmunofluorescencia.** Los linfocitos de ratón se cultivaron en cajas de 24 pozos ( $1 \times 10^6$  células por pozo) en medio RPMI, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y en presencia de PHA por 24 h. Se mantuvieron en una cámara húmeda a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al momento de la cosecha, los cultivos de linfocitos de ratón fueron lavados dos veces con PBS frío suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado y 0.01% de azida de sodio. Un millón de células se resuspendieron en 100 µl de PBS y se adicionó 1 µg de anticuerpo anti-CD3-FITC/CD4-PE/CD8-PerCP o de anti-CD3-FITC/CD25-PE. Las células se incubaron a 4°C por 1 h en oscuridad, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PBS con 1% de  $\rho$ -formaldehído. Se analizaron 10,000 células por muestra en un citofluorómetro de flujo.

**Análisis estadístico.** Se utilizó la prueba de t de Student para determinar las diferencias estadísticas en todos los casos. Se utilizó además la prueba de heterogeneidad de chi cuadrada para determinar si el comportamiento de cada uno de los individuos en este estudio era homogéneo o presentaba diferentes tendencias. Se consideraron valores estadísticamente significativos a aquellos que tuvieran  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS

Como se puede observar en los estudios anteriormente mostrados (The Immunosuppressant Effect of Sodium Arsenite on Human Lymphocytes *in vitro*. I y II), la respuesta proliferativa de los linfocitos humanos mostró una gran variabilidad, tanto al estímulo mitogénico con PHA, como al efecto del As. Los índices de inhibición de la proliferación, para la concentración más alta de arsenito de sodio utilizada, estuvieron comprendidos entre el 40 y el 95% de inhibición. La respuesta proliferativa al estímulo mitogénico también tuvo una gran variación en cuanto a las cuentas por minuto de tritio detectadas en los cultivos no tratados para cada individuo (desde 4,268 hasta 32,591 cpm).

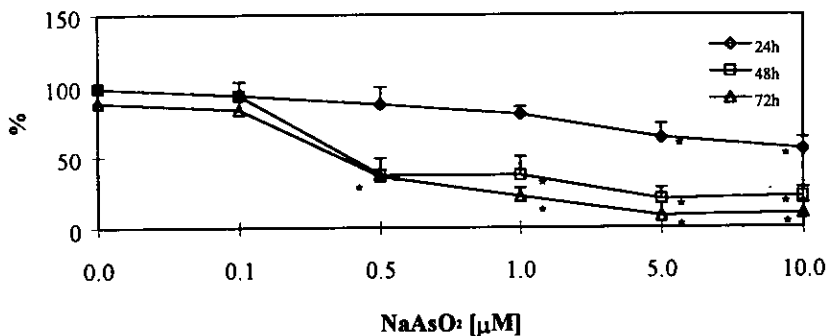
Para determinar si esta variabilidad podía deberse al sistema utilizado en las determinaciones realizadas o a variaciones intrínsecas de los individuos, se decidió comparar los efectos encontrados en la proliferación celular en cultivos de linfocitos humanos, que por su naturaleza, están formados de poblaciones celulares heterogéneas, con los efectos en la proliferación, producidos por el arsenito de sodio, en cultivos de líneas celulares con poblaciones de tipos celulares únicos. Se utilizaron células CTLL-2 (línea linfoblastoide de células CTL de ratón) y P3X63.Ag8.653 (línea linfoblastoide de células B de ratón).

Al comparar estos datos con los obtenidos en linfocitos humanos sobre la viabilidad y la proliferación (capítulo III), se pudo observar que los linfocitos humanos muestran una gama de variación, que además mostró estar comprendida en el rango de efecto detectado entre los otros dos tipos celulares utilizadas.

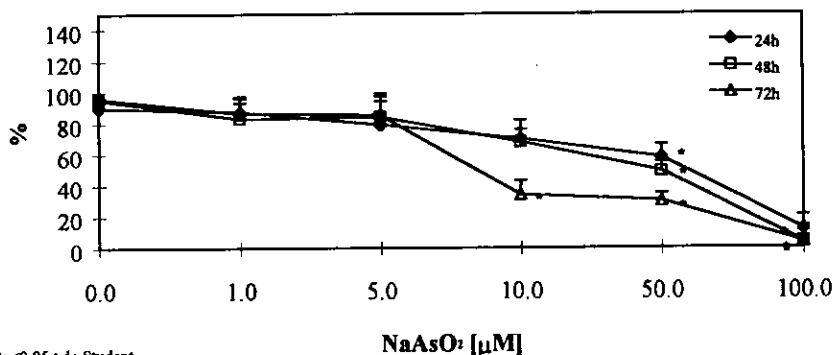
Al comparar la sensibilidad a los efectos tóxicos del arsenito de sodio en tres tipos diferentes de células (CTLL-2, P3X63.Ag8.653 y linfocitos humanos), mediante la determinación de la viabilidad celular, utilizando dos métodos diferentes (exclusión de azul tripano y formación de metabolitos de MTT), se pudo observar que la línea celular P3X63.Ag8.653 fue la más resistente, ya que se necesitaron concentraciones más altas de arsenito de sodio para observar los efectos tóxicos de este compuesto sobre la viabilidad (figuras 7 y 9), y la proliferación en esta línea celular (figura 11), compuesta de células B de ratón. Por otro lado, las células CTLL-2 (células CTL de ratón) fueron más sensibles al arsenito de sodio, tanto en la viabilidad (figuras 6 y 8), como en la proliferación (figura 10).

Por otro lado se puede observar también que la evaluación de la viabilidad celular determinada por exclusión de azul tripano (figuras 6 y 7), o metabolitos de MTT (figuras 8 y 9), muestra resultados diferentes, y que sólo en algunas ocasiones pueden correlacionarse. En el caso de las células P3X63.Ag8.653, los dos tipos de determinaciones de la viabilidad muestran los mismos resultados, no así con las células CTLL-2, ni en el caso de los linfocitos humanos.

**Figura 6. Determinación de la viabilidad por exclusión de azul tripano en células CTLL-2 tratadas con arsenito de sodio durante 24 h**



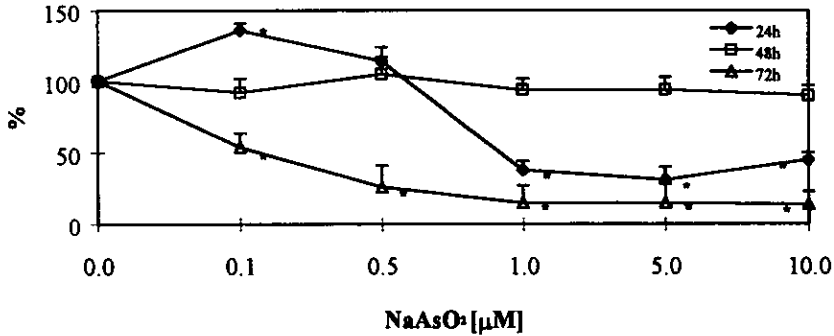
**Figura 7. Determinación de la viabilidad por exclusión de azul tripano en células P3X63.Ag8.653 tratadas con arsenito de sodio durante 24 h.**



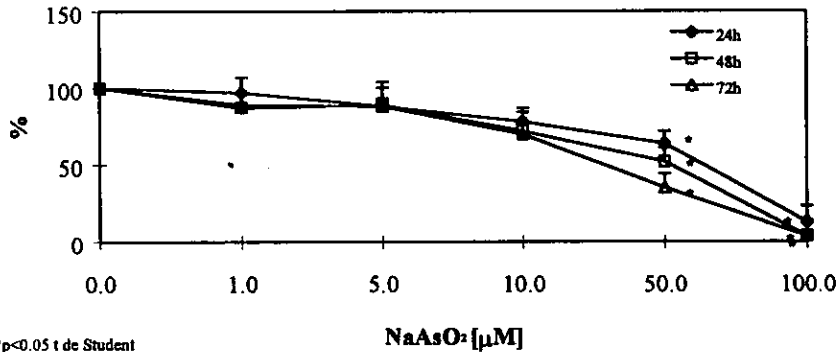
\*p<0.05 t de Student

El ensayo de exclusión de azul tripano determina integridad de la membrana plasmática, mientras que el ensayo de la cuantificación de metabolitos del MTT determina la actividad mitocondrial. Dadas las características específicas de cada uno de los tipos de determinaciones de la viabilidad y de la naturaleza de los efectos del arsénico, se decidió utilizar la determinación de la viabilidad con el ensayo de metabolitos del MTT como el parámetro adecuado para hacer las comparaciones de viabilidad entre los tres tipos celulares.

**Figura 8. Determinación de la viabilidad por metabolitos de MTT en células CTLL-2 tratadas con arsenito de sodio durante 24 h.**



**Figura 9. Determinación de la viabilidad por metabolitos de MTT en células P3X63.Ag8.653 tratadas con arsenito de sodio durante 24 h.**



\*p<0.05 t de Student

Después de analizar los datos de viabilidad y proliferación en las líneas celulares, se determinó que las variaciones encontradas en respuesta al arsénico en los linfocitos humanos, se debían a variaciones intrínsecas de los individuos, y por lo tanto, aunque muy heterogéneas, eran representativas.



Figura 10. Porcentaje de incorporación de timidina tritiada en células CTLL-2 tratadas con arsenito de sodio durante 24 h.

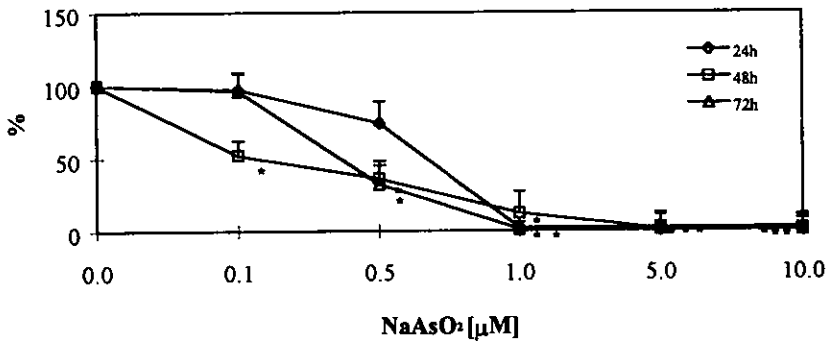
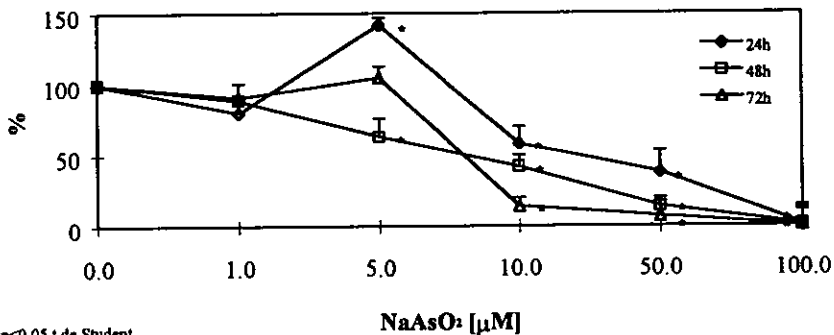


Figura 11. Porcentaje de incorporación de timidina tritiada en células P3X63.Ag8.653 tratadas con arsenito de sodio durante 24 h.



\*p<0.05 t de Student

Para poder determinar la causa de la inhibición en la proliferación de los linfocitos humanos, se decidió evaluar uno de los eventos principales en el proceso de activación de los linfocitos en respuesta a un estímulo mitogénico como la PHA. Estos fueron la expresión del receptor para IL-2 (CD25) y la secreción de esta proteína en linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio por 24 h.

Como se pudo observar en los datos presentados en el capítulo III, la expresión del receptor para IL-2 no se vió afectada por el tratamiento, y se encontró una reducción en la secreción de IL-2.

Al realizar los estudios del efecto del arsénico sobre la secreción de IL-2 en linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio, también se estudió el efecto del arsénico residual sobre la línea celular utilizada en el bioensayo de células CTLL-2, con la finalidad de descartar

cualquier inhibición en la proliferación de la línea celular causada por el arsenito de sodio a las concentraciones utilizadas.

Como se muestra en la tabla 7, no se observó una inhibición en la proliferación de estas células a las concentraciones de arsenito de sodio a las que pudieron estar en contacto al momento de realizar el bioensayo con diluciones del medio proveniente de cultivos de linfocitos tratados con arsénico. Tampoco se detectaron diferencias en cuanto al crecimiento de las células CTLL-2 cuando se pusieron en contacto con IL-2 hr que fue tratada con varios ciclos de congelación a -20° C, y calentamiento a 37 °C.

**Tabla 7. Curva control de IL-2 humana recombinante en células CTLL-2. Crecimiento de CTLL-2 en presencia de IL-2 hr con arsenito de sodio y con IL-2 hr después de 3 ciclos de congelación**

IL-2 U/ml	control	cpm	IL-2 congelación
		NaAsO <sub>2</sub> 0.02 [μM]	
0.0	594±50	545±54	504±51
0.03	976±74	905±92	940±52
0.06	1722±153	1700±103	1608±84
0.1	12207±987	11562±1101	11033±1005
0.3	42177±3598	41020±3694	40203±2961
0.6	72781±4523	72031±5700	70109±5059
1.0	93772±5801	91302±5921	89024±4932
3.0	148809±6524	134526±6003	132425±6217

Después de observar que el arsenito de sodio es capaz de inhibir la proliferación celular en linfocitos humanos, y que este efecto es ocasionado por una alteración en la secreción de interleucina 2 (capítulo III), se decidió investigar si podían existir cambios en la proporción de subpoblaciones de linfocitos como respuesta al tratamiento con arsenito de sodio, como respuesta a una cierta toxicidad selectiva por parte del arsenito de sodio hacia diferentes tipos celulares, como parecía ocurrir entre las líneas de células T, CTL y linfocitos B.

Ya que anteriormente se ha descrito que algunos metales son capaces de interferir con la unión ligando-receptor, debido a una interacción del metal con grupos sulfhidrilos que estabilizan a las moléculas blanco, y dado que el arsenito de sodio comparte esta característica con los metales, se decidió realizar un estudio inicial sobre la capacidad del arsenito de sodio para interferir con la unión anticuerpo-receptor antes de determinar las subpoblaciones linfocitarias presentes en los cultivos de linfocitos humanos tratados.

Se encontró que, cuando las células son expuestas por 2 h al arsenito de sodio y posteriormente retirado del medio de cultivo, al realizar la determinación de marcadores de membrana constitutivos, tales como el CD3, CD4 y CD8, los niveles de estos marcadores de

membrana aparecían como proporciones variables en los cultivos de linfocitos humanos, dependiendo del tiempo de recuperación después del lavado de los linfocitos (figura 12).

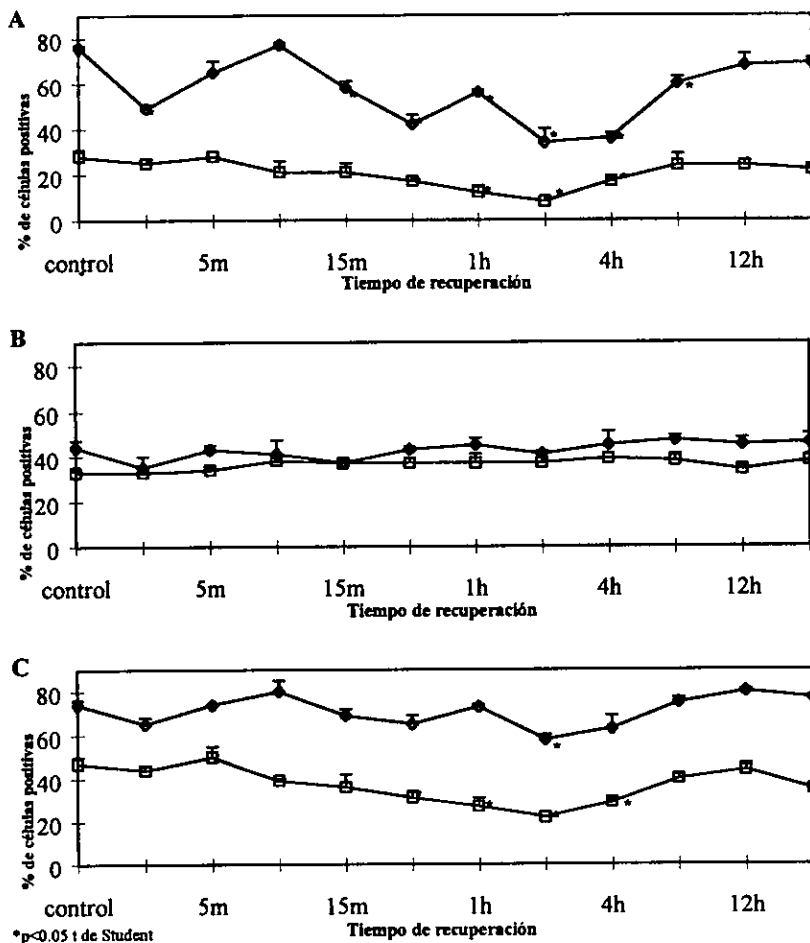


Figura 12. Efecto del arsenito de sodio sobre la unión antígeno-anticuerpo; A) CD3, B) CD4 y C) CD8 en linfocitos humanos en fase G0 tratados *in vitro* (1.0  $\mu$ M) por 2 h.

Estos datos nos indicaron que el arsenito de sodio interfiere con la unión del anticuerpo al antígeno específico, que esta interferencia se elimina aproximadamente a las 12 h de haber sido lavadas las células y por lo tanto, después de un periodo de tiempo considerable (más de 12 h) se podían determinar los niveles reales de estas moléculas por inmunofluorescencia. La interferencia en esta reacción, ocasionada por el arsenito de sodio, pudo observarse tanto en el reconocimiento de la molécula CD3 (figura 12A), como en el reconocimiento de la molécula CD8 (figura 12C), pero no así en el reconocimiento de la molécula CD4 (figura 12B), probablemente debido a que estos tres marcadores fenotípicos tienen, cada uno de ellos, diferencias en cuanto al número y ubicación de los grupos sulfhidrilos que contienen.

Estos cambios se observaron no sólo en cuanto a la proporción de células marcadas con el anticuerpo específico, sino también en cuanto a la media de fluorescencia por célula marcada (tabla 8).

**Tabla 8. Determinación de la media de fluorescencia en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio (1.0  $\mu\text{M}$ ) por 2 h. Inmunofluorescencia directa para las moléculas CD3, CD4 y CD8.**

Tiempo de recuperación	Media de fluorescencia					
	CD 3		CD 4		CD 8	
	H	M	H	M	H	M
testigos	46±2	57±1	146±3	147±13	210±10	164±7
0 min	52±3	54±0	149±12	138±10	209±13	157±12
5 min	48±4	54±2	163±7	156±12	189±14	151±13
10 min	61±2*	51±3	194±12*	136±10	268±3*	129±12
15 min	51±4	53±4	147±14	129±3	202±11	134±11
30 min	43±1	52±2	115±13	106±12	165±10	128±1*
1 h	36±0*	42±3*	107±2*	86±1*	137±2*	119±7*
2 h	33±2*	35±1*	89±9*	70±1*	116±13*	112±10*
4 h	42±3	47±3	110±12*	102±8*	152±7*	135±10
8 h	46±0	49±2	149±13	140±7	167±14	128±3*
12 h	40±3	54±4	115±11	122±11	153±1*	134±13
24 h	48±2	55±1	131±9	115±9	174±13	126±12

Promedio de tres experimentos ± D. E. H: hombre, M: mujer, \* $p < 0.05$  t de Student

Después de haber determinado que la interacción antígeno anticuerpo se recupera después de 12 h, se decidió estudiar el efecto del arsenito de sodio sobre las subpoblaciones linfocitarias expuestas a *As* por 24 h y cultivadas por 72 h más (tiempo suficiente para eliminar este efecto inicial del arsenito de sodio). Se pudo observar que los linfocitos, mantenidos en reposo durante

todo el periodo de cultivo, y tratados con arsenito de sodio, no muestran cambios evidentes en la composición de las subpoblaciones, tanto en el porcentaje de células positivas, como en la media de fluorescencia celular (tabla 9), y que ya no se observa el fenómeno de interferencia en la unión antígeno-anticuerpo.

**Tabla 9. Determinación de la proporción de células positivas y de la media de fluorescencia en cultivos de linfocitos humanos (72 h) tratados *in vitro* en fase G0.**

NaAsO <sub>2</sub> [μM]	Marcadores					
	CD3		CD4		CD8	
	%	X Fluor	%	X Fluor	%	X Fluor
0.0	100±6	87±39	100±9	68±28	100±7	273±154
0.01	90±16	89±37	93±18	64±24	95±9	255±120
0.1	103±13	84±29	99±10	63±22	93±11	282±138
1.0	94±22	86±37	93±18	57±24	96±13	276±168

Promedio de 11 individuos ± D.E.

Los linfocitos humanos tratados con arsenito de sodio, y que fueron activados con PHA por 72 h, muestran algunas pequeñas variaciones en la composición de las subpoblaciones que, en ningún caso fue significativa, estos cambios también se observaron en cuanto a la determinación de la media de fluorescencia celular (tabla 10).

**Tabla 10. Determinación de la proporción de células positivas y la media de fluorescencia en cultivos de linfocitos humanos activados (72 h) tratados *in vitro* en fase G0.**

NaAsO <sub>2</sub> [μM]	Marcadores					
	CD3		CD4		CD8	
	%	X Fluor	%	X Fluor	%	X Fluor
0.0	100±5	31±8	100±11	25±6	100±5	71±38
0.01	116±32	35±13	108±20	25±5	113±10	75±47
0.1	105±25	36±16	105±31	25±6	103±19	77±52
1.0	104±30	35±11	110±46	25±7	103±24	68±32

Promedio de 5 individuos ± D.E.

Una vez establecido que las subpoblaciones de linfocitos humanos no se alteran en respuesta al tratamiento *in vitro* con arsenito de sodio, se decidió buscar un modelo animal en el que los efectos producidos por el metaloide en linfocitos humanos pudieran ser reproducibles. Se seleccionó un modelo experimental de ratones transgénicos TC.AC que presentan el promotor de  $\gamma$ -globulina fetal fusionado al gen estructural de v-Ha-ras y unido a una secuencia de poliadenilación del virus SV40. Estos ratones fueron tratados por 4 semanas con arsenito de sodio (0.02%) en el agua de bebida, el grupo control recibió agua corriente por el mismo periodo.

Como se muestra en la tabla 11, estos ratones presentan una incidencia de papilomas mayor cuando son tratados con arsenito de sodio y un promotor como el TPA (tomada de *Germolec et al., 1997*). Las células del bazo de estos ratones fueron extraídas y cultivadas por 24 h en presencia de PHA, en estas células se estudió la respuesta proliferativa y la composición de sus subpoblaciones. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 12, después de 24 h del estímulo mitogénico, no se observaron cambios en cuanto a la respuesta proliferativa a la PHA, ni en la composición de la población linfocitaria del bazo de estos animales. Tampoco se detectó ningún cambio en la expresión del receptor de IL-2 que resultara de esta exposición a As.

**Tabla 11. Número de papilomas inducidos en ratones TG.AC por arsenito de sodio (0.02%) suministrado en el agua de bebida por 4 semanas.**

semana después del tratamiento	testigos	Tratamiento		
		NaAsO <sub>2</sub>	TPA	NaAsO <sub>2</sub> + TPA
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	2	7
5	0	0	2.5	13
6	0	0	5	19
7	0	0	5.5	20
8	0	0	6	21

n=20 (tomado de *Germolec et al., 1997*).

Debido a lo anterior se consideró que este modelo experimental no es el adecuado para el estudio de los efectos del arsenito de sodio sobre elementos del sistema inmune, y por la misma causa se decidió no continuar los estudios de los efectos del metaloide sobre los demás parámetros inmunotoxicológicos observados en linfocitos humanos.

**Tabla 12. Determinación de la proliferación celular y las subpoblaciones linfocitarias en células de bazo de ratones TG.AC tratados *in vitro* con arsenito de sodio (0.02%) por 4 semanas.**

<b>Parámetro</b>	<b>Testigos</b>	<b>Tratados</b>
<b>cpm</b>	72020± 2165	87033± 3104
<b>CD3</b>	25.4± 3.2	23.6± 5.4
<b>CD4</b>	20.1± 3.7	21.1± 5
<b>CD8</b>	5.9± 1.3	4.4± 1.6
<b>CD25</b>	56± 6	51± 4
<b>n</b>	13	11

## CAPÍTULO VI

### DISCUSIÓN

Anteriormente ya se ha demostrado que el tratamiento de linfocitos humanos *in vitro* con *As*, es capaz de alterar marcadores de activación y proliferación celular, tales como el índice de marcaje (cuantas células llegan a la fase de síntesis de ADN después de la activación con un mitógeno), el índice mitótico (proporción de las células activadas que llegan a la fase de mitosis) y el índice de replicación (proporción de replications celulares por unidad de tiempo) (Gonsebatt *et al.*, 1992).

Como un primer paso para determinar los mecanismos por los cuales se producen estas alteraciones, se examinaron algunos de los eventos centrales en la activación y proliferación de las células T; la secreción de IL-2, la concentración intracelular de IL-2, la expresión del gen de IL-2, la inducción del receptor de IL-2 y la constitución de las subpoblaciones linfocitarias en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* y en células de bazo de ratones TG.AC tratados *in vivo*.

La activación de los linfocitos T normales inducida por mitógenos, como la PHA, induce un incremento de cien veces en la expresión de la molécula CD25 (receptor de IL-2) en la membrana celular, e induce un incremento de 50 veces en la secreción de IL-2 (Smith 1989). En este estudio se encontró que el tratamiento con arsenito de sodio (1.0  $\mu$ M), reduce la respuesta proliferativa de los linfocitos hacia el mitógeno (PHA), al ser determinada por incorporación de timidina tritiada, de manera dosis dependiente, y que, además, esta inhibición en la proliferación celular, aumenta conforme el tiempo de cultivo, en presencia del mitógeno es mayor. La inhibición, observada en la proliferación, no es debida a efectos tóxicos del metaloide sobre los cultivos celulares, puesto que las determinaciones de la viabilidad realizadas indicaron que esta se mantiene dentro del rango del 90 al 100%.

Las diferencias en la susceptibilidad observadas, tanto en la viabilidad como en los efectos causados en la proliferación celular de los tres tipos de células, pueden explicarse cuando se consideran los tipos celulares utilizados. Las células CTLL-2 son una línea linfoblástica de células T citotóxicas de ratón. Por otro lado, las células P3X63.Ag8.653 son una línea linfoblástica de células B de ratón. Dentro de los cultivos de linfocitos humanos podemos encontrar diferentes proporciones de células B y T en cada uno de los individuos estudiados.

La diferencia en la composición celular hace posible, que en cada uno de estos tipos celulares, se observen diferentes efectos causados por el arsenito de sodio, ya que se ha determinado que el efecto del *As* es diferente dependiendo del tipo de célula en el que se encuentra. Esto es debido a que, la cantidad de moléculas blanco, susceptibles de ser afectadas por el *As*, varíe dependiendo de características metabólicas y fisiológicas específicas de cada tipo celular (Descotes, 1988).

Por otro lado, también debe considerarse, como otro factor importante para estas diferencias en cuanto al efecto que el arsenito de sodio pueda ejercer, es la fase del ciclo en la que



las células se encuentren al momento de estar en contacto con el arsénico, ya que esto determinará el tipo y cantidad de proteínas que contengan estas células.

El ensayo de exclusión de azul tripano determina, de manera general, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, al ser un colorante vital de fácil difusión en la célula, continuamente entra en esta y, sólo si los mecanismos de transporte extracelular son funcionales, o la membrana no presenta daño puede observarse que las células efectivamente excluyan el colorante.

El ensayo de metabolitos de MTT determina, de forma también general, la funcionalidad de las mitocondrias en la célula, ya que el ensayo determina la cantidad de uno de los metabolitos de MTT que se producen por elementos de la cadena respiratoria dentro de la mitocondria. Ninguno de estos dos ensayos puede ser enteramente confiable para la determinación de la viabilidad, pero entre los dos se puede tener una idea aproximada de la cantidad de daño que se produce a las células en cultivo.

En los ensayos realizados en este estudio encontramos, también, que la secreción de IL-2 en los cultivos de linfocitos humanos se redujo entre un 50 y 100% en los sobrenadantes de los cultivos primarios, y que la concentración intracelular de IL-2 aumentó en las células tratadas, mientras que la inducción de la molécula CD25 no se alteró, al igual que la expresión del gen de IL-2 a nivel de ARN mensajero. Estos datos podrían ser interpretados como una secreción subóptima de ligando del receptor a IL-2 que podría no ser suficiente para mantener la proliferación celular a sus niveles máximos.

Anteriormente se ha reportado que, bajo ciertas condiciones (dependiendo del patrón de activación celular), la secreción de IL-2 puede ser inducida sin aumentar la expresión de la molécula CD25 y al contrario (*Weiss e Imboden, 1987*). Es interesante hacer notar que algunos compuestos de mercurio pueden inhibir la proliferación celular *in vitro*, reduciendo notablemente la secreción de IL-2 y alterando la inducción de la molécula CD25, sin alterar otros marcadores tempranos de activación, como la molécula CD69 (*Shenker et al., 1992*). Estos datos indican que los compuestos de mercurio no alteran los estados iniciales de activación celular, pero que interfieren con procesos específicos tardíos en los patrones de activación celular, tal como el *As* parece hacerlo.

Nuestros resultados sugieren que la inhibición en la incorporación de timidina tritiada en las células T inducida por el tratamiento con arsenito de sodio, podría ser explicada, al menos en parte, por la inhibición de la secreción de IL-2, puesto que la adición de IL-2hr a los cultivos tratados, revirtió, de manera dosis-respuesta, el efecto inhibitorio del *As*, y solo la secreción, y no la síntesis, de esta proteína esta inhibida, ya que se pudo detectar niveles mayores de IL-2 intracelular con actividad biológica. Además de que la expresión del gen se mantiene a niveles normales. La síntesis de proteínas, al menos de las moléculas CD3, CD4, CD8 y CD25 (marcadores de membrana), también se mantuvo a niveles normales, ya que en todo momento, se detectó la misma cantidad de estas proteínas. Estos datos nos sugieren, también, que la síntesis de proteínas no se altera por la presencia del arsenito de sodio en las células, y que la presentación

de otras proteínas en la membrana celular tampoco esta afectada. estos mismos datos, también indican que la alteración puede estar a nivel de proteínas exclusivamente de secreción.

El arsenito de sodio tiene la capacidad de unirse a grupos sulfhidrilos, y de reaccionar con grupos tioles de proteínas celulares (*Squibb y Fowler, 1983*). Una unión disulfuro muy importante para la actividad biológica de la IL-2 se encuentra entre los residuos de cisteína 58 y 105, esta unión es crítica para la formación de la estructura terciara de la proteína, de la que depende su actividad biológica (*Smith 1989*). Se ha reportado que la reducción de esta unión disulfuro elimina completamente la actividad biológica de la IL-2 (*Yamada et al., 1987*).

Exite la posibilidad de que se secreten niveles normales de IL-2 por las células tratadas, y que la presencia del metaloide en el medio de cultivo inactive a la linfocina. Esta posibilidad resultó no ser el caso en estos experimentos, puesto que las determinaciones de la alteración de la proliferación celular en células CTLL-2 demostró que se pueden recobrar las cantidades iniciales de IL-2 adicionada al medio de cultivo con concentraciones bajas de arsenito de sodio.

El *As* comparte con los metales pesados esta capacidad de unirse a grupos sulfhidrilos, y como consecuencia, también la capacidad de interferir con muchas propiedades y funciones normales de las células. El *As* puede producir alteraciones ultraestructurales en los linfocitos humanos, aún en estado de reposo, que estan relacionadas con alteraciones en la funcionalidad del citoesqueleto (*Yamashina 1995*). Se ha reportado que el arsenito de sodio puede interferir con el ensamblaje de los microtúbulos (*Ramírez et al., 1997*) y la estabilidad del citoesqueleto puesto que tiene un efecto muy parecido al de la colchicina y puede producir arresto mitótico (*Vega et al., 1995*). Este efecto parece estar intimamente ligado con la interferencia del *As* con los grupos sulfhidrilos, ya que estos son necesarios para lograr la correcta polimerización y despolimerización de la tubulina para formar el huso mitótico o constituir el citoesqueleto y para el anclaje y transporte intracelular de organelos celulares (*Ramírez et al., 1997*).

Este mismo efecto ha sido encontrado también con otros metales, tales como el mercurio y el hierro (*Santos y De Sousa, 1994; Wolfe et al., 1994*). La perturbación del transporte de proteínas exportables (tales como la IL-2) parece ser uno de los mayores efectos producidos por la desorganización estructural del aparato de Golgi, que es mantenida por el citoesqueleto (*Yamashina 1995*), aunque aún no se ha determinado el mecanismo por el cual sólo este tipo de transporte intracelular se puede ver afectado.

El hecho de encontrar alteración en el transporte intracelular de un tipo particular de proteínas, como en estos casos, unicamente de proteínas secretadas, nos indica que existe una cierta particularidad en las vesículas con ese destino que las hace susceptibles de ser alteradas, que posiblemente sean las moléculas de señalización de estas vesículas y sobre las que debería llevarse a cabo un estudio particular de los efectos que puedan provocarse en ellas por el arsenito de sodio.

También se ha reportado que la producción de citocinas por células activadas produce cambios estructurales específicos en el aparato de Golgi (*Agre et al., 1966; Björk et al., 1996*), y que la adición de brefeldina A (una lactona macrocíclica), inhibe la secreción de interleucinas

biológicamente activas alterando el aparato de Golgi, y así causando acumulación intracelular de estas proteínas (Kuhnle et al., 1996).

El citoesqueleto también está relacionado con el movimiento de vesículas exportables (Alberts et al., 1994; Stichcombe et al., 1995); una posible explicación a la reducción de la secreción de IL-2 se puede deber a alteraciones en este transporte extracelular, puesto que en las células tratadas con As se pueden observar el aumento de tamaño de las cisternas del aparato de Golgi y la acumulación de vesículas, además de alteraciones en el citoesqueleto, todas estas son evidencias de la inhibición del transporte intracelular. Ya que se ha reportado que el arsenito de sodio es capaz de inhibir, tanto la polimerización como la despolimerización de la tubulina (Ramírez et al., 1997), es de suponer que la interacción del citoesqueleto con las vesículas exportables esté alterada.

Aunque se ha reportado que el arsénico es capaz de alterar la expresión de algunos genes a nivel de ARN mensajero, tales como el de la involucrina, el de la transglutaminasa (Kachinskas et al., 1994), el del interferón- $\gamma$ , el de la IL-6 (Germolec et al., 1996) y el del factor de crecimiento tumor- $\alpha$  (Germolec et al., 1997), no pudimos demostrar este mismo efecto sobre el gen de IL-2 en cuatro de los cinco donadores utilizados en este estudio. En uno de los individuos se detectó una reducción en la expresión del gen de IL-2 a nivel de ARN mensajero de aproximadamente el 50%, este individuo mostró la máxima inhibición en la proliferación celular y la mayor proporción en la inhibición de la secreción de IL-2. Estos datos podrían indicar que este individuo es más susceptible a los efectos del As que el resto de los individuos estudiados.

En cuanto a los efectos del As en la unión antígeno-anticuerpo, se ha propuesto que esta alteración puede ser causada por la interacción que el As pueda tener con los grupos sulfhidrilos, de los cuales el complejo llamado CD3 presenta 5, la molécula CD8 tiene 4 y la molécula CD4 muestra sólo 3 grupos sulfhidrilos en los dominios extracelulares de cada una de estas moléculas (Abbas et al., 1994). Esto tal vez pueda explicar por qué cada una de estas moléculas se ve afectada de manera diferente.

Este efecto ya había sido reportado en estudios con algunos metales como el mercurio y el hierro (Santos y De Sousa, 1994; Wolfe et al., 1994), también se ha propuesto que estos metales pesados puedan interactuar con los antígenos cambiando su conformación tridimensional y que su unión con las moléculas es de manera no covalente y por lo tanto reversible. Este efecto es debido a competencia del hierro por sitios de reconocimiento entre el ligando y el anticuerpo, por lo que es dependiente de la concentración del metal en el medio externo de las células (Santos y De Sousa, 1994; Wolfe et al., 1994).

El hecho de que el As presente un comportamiento similar indica que la interacción del arsenito de sodio, ya sea con el anticuerpo o con los antígenos específicos, puede producir únicamente un cambio estructural pasajero que no permite el adecuado reconocimiento del antígeno por el anticuerpo.

En la realización de este estudio se observaron diferencias individuales en la susceptibilidad a los efectos del arsenito de sodio entre los individuos. Estas diferencias pueden

estar relacionadas a variaciones intrínsecas naturales en la respuesta inmune de los individuos. Se ha reportado que las fuentes potenciales de esta variación en los marcadores de inmunotoxicidad, y respuestas inmunes interindividuales, pueden ser el resultado de variaciones genéticas, influencia ambiental, edad, estado nutricional y estado de salud (*Beswick et al., 1995*). La mayoría de estos parámetros no pueden ser controlados puesto que dependen de características particulares de los donadores y los estudios *in vitro* muestran parte de esta heterogeneidad individual.

Existen algunos otros reportes que indican que las diferencias en la susceptibilidad son muy comunes cuando se estudian sustancias mutagénicas, tóxicas, u otro tipo de xenobióticos en humanos (*Ostrosky-Wewgman et al., 1986; Wiencke y Yager, 1992; Elizondo et al., 1994*).

La metilación es considerada una de las vías de detoxificación natural del *As* en las células (*Aposhian y Aposhian, 1989; Bodgan et al., 1994*), los humanos metilan el *As* a las formas menos tóxicas y más rápidamente excretables; ácido metilarsónico (MMA 10-20%), y ácido dimetilarsínico (DMA 60-80%). La eficiencia en la metilación podría estar relacionada con la concentración de metionina, y la actividad de la enzima metil-transferasa (*Vahter et al., 1995*). Sin embargo, se conoce muy poco al respecto de polimorfismos genéticos en estos elementos relacionados con la metilación y la detoxificación del *As* (*Offergelt et al., 1992; Yamauchi et al., 1992; Hopenhayn et al., 1996*).

En este estudio se demostró también que el modelo animal seleccionado no reprodujo ninguno de los efectos inmunotoxicológicos encontrados en linfocitos humanos expuestos *in vitro*, ni en poblaciones humanas expuestas a *As* por la misma vía. Aunque este modelo ha resultado eficiente en la reproducción de los efectos del arsenito de sodio en cuanto a las alteraciones cutáneas producidas en humanos, es necesaria la búsqueda de un modelo animal alternativo para el estudio de marcadores de inmunotoxicidad.

Dado el gran número de posibles moléculas blanco para la acción del arsénico es muy difícil identificar un modelo *in vivo* que refleje los mismos efectos que se encuentran en individuos humanos expuestos a este metaloide, pueden determinarse algunos modelos para el estudio de efectos específicos, aunque aislados. Un modelo para los estudios de los efectos tóxicos del arsenicotendría que estar basado en la determinación similar de proteínas blanco del arsénico, todas aquellas que presentan grupos sulfhidrilos y grupos tioles expuestos en su estructura.

Por lo tanto, es evidente que el *As* puede producir diferentes efectos en una gran variedad de células, y que es también posible que otros eventos en los procesos de activación, u otras subpoblaciones celulares esten siendo alterados. El efecto del *As* sobre estos otros eventos debe ser investigado.

## CONCLUSIONES

La exposición a arsenito de sodio, tanto en cultivos de linfocitos humanos *in vitro*, como en ratones transgénicos *in vivo*, no altera la composición celular de las subpoblaciones

linfocitarias.

Existen diferencias en cuanto a la susceptibilidad de los individuos estudiados a los efectos producidos por el tratamiento *in vitro* con arsenito de sodio.

La línea celular derivada de células T citotóxicas es más sensible a los efectos tóxicos del arsenito de sodio que la línea celular derivada de células B, los linfocitos humanos tienen una sensibilidad intermedia entre estos dos tipos celulares.

El modelo animal *in vivo*, seleccionado por su respuesta similar en cuanto a afecciones cutáneas producidas por el As en humanos, no reflejó ninguno de los efectos encontrados en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro*, por lo que no se considera un buen modelo para estudiar los efectos inmunotoxicológicos del arsenito de sodio.

El arsenito de sodio no interfiere con la expresión del gen de IL-2 a nivel de ARN mensajero, pero es capaz de producir cambios en la secreción de esta proteína en linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio.

El arsenito de sodio es capaz de producir cambios ultraestructurales importantes en linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio, tanto en linfocitos en la fase de reposo como en linfocitos activados.

La exposición a arsenito de sodio puede crear un estado de inmunosupresión celular determinado la interferencia de la secreción de al menos la proteína IL-2, que es necesaria para la progresión del ciclo celular en linfocitos activados.

El arsenito de sodio es capaz de interferir con la interacción de un antígeno con su anticuerpo, y por lo tanto con la unión ligando-receptor, cuando se encuentra presente.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas A., Lichtman A., Pober J. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Co. Philadelphia, USA. 1994, 417pp.
- Aposhian H. Biochemical toxicology of arsenic. *Rev Biochem Tox* 1989; 10:265.
- Bates M, Smith A, Hopenhayn-Rich C. Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am J Epidemiol* 1992; 135:462.
- Aposhian H., Aposhian M. Newer developments in arsenic toxicity. *J Am Coll Toxicol* 1989; 8: 1297.
- Barbers R, Shih W, Saxon A. In vitro depression of human lymphocyte mitogen response (phytohemagglutinin) by asbestos fibers. *Clin Exp Immunol* 1982; 48:602.
- Baur X, Dewair M, Fruhmann G. Detection of immunologically sensitized isocyanate workers by RAST and intracutaneous skin tests. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:610.
- Bencko V. Arsenic. En: *Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Occurrence and Exposure*. Fishbein L, Furst A, Mehlman M. Princeton Scientific Publishing Co. Princeton New Jersey 1987; 1.
- Berger N, Skinner A. Characterization of lymphocyte transformation induced by zinc ions. *J Cell Biol* 1974; 61:45.
- Bick P. The immune system: Organization and function. En: Dean J, Luster M, Munson A, Amos H. *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. New York Raven 1985: 1.
- Bialock J. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 1989; 69:1.
- Bodgan G., Sampayo-Reyes A., Aposhian H. Arsenic binding proteins of mammalian system: I. Isolation of three arsenite-binding proteins of rabbit liver. *Toxicol* 1994; 93: 175.
- Branhuber B, Boone T, Kenney W, McKay D. Three-dimensional structure of interleukin 2. *Science* 1987; 238: 1707.
- Buchet J, Lauwreys R. Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro: Relevance for the interpretation of observations in man. *Arch Toxicol* 1985; 57: 125.
- Casarett y Doull's. Toxicology. The basic science of poisons. Pergamon Press USA 1991.
- Castilla J, Rueda R, Vargas M, Gonzalez F, García E. Decreased levels of circulating CD4+ T lymphocytes during normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1989; 15:103.
- Chandra R. Nutrition and immunity: I. Basic considerations, II. Practical applications. *J Dent Child* 1987; 54:193.
- Chandra R, Wadhwa R. Nutritional modulation of intestinal mucosal immunity. *Immunol Invest* 1989; 18:119.
- Ciardelli T, Landgraf B, Galski R, Strand J, Cohen F, Smith K. A semisynthesis protein engineering approach to the structural analysis of interleukin 2. *Molec. Recogt.* 1987; 1: 42.
- Clark E, Ledbetter A. How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994; 367:425.
- Cohen N, Modai D, Golik A, Weissgarten J, Peller S, Katz A, Averbukh Z, Shaked U. Increased concanavalin A-induced suppressor cell activity in humans with occupational lead exposure. *Environ Res* 1989; 48:1.
- Corre F, Lellouch J, Schwartz D. Smoking and leukocyte counts. Results of an epidemiological survey. *Lancet* 1971; 2:632.
- Czuprynsky C, Henson P, Campbell P. Effects of dimethylsulfoxide on the in vitro and in vivo bactericidal activity of human and mouse neutrophils and mononuclear phagocytes. *Inflammation* 1984; 8:181.
- Dean J, Luster M, Boorman G, Lauer L. Procedures available to examine the immunotoxicity of chemicals and drugs. *Pharmacol Rev* 1982; 34:137.
- Dean J, Murray M. Toxic responses of the immune system. En: Casarett y Doull's. Toxicology. The basic science of poisons. Pergamon Press, USA 1991; 282-333.
- Descotes J. Immunotoxicology of drugs and chemicals. Amsterdam Elsevier. 1988: 444.
- Devens B, Koontz A, Kapp J, Pierce C, Webb D. Involvement of two distinct regulatory T cell populations in the antigen-specific suppression of cytolytic T cell generation. *J Immunol* 1991; 146:1394.
- Diaz-Barriga F, Santos M, Yañez L, Cuéllar J, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Pérez A, Ruiz E, García A. Gómez H. Biological monitoring of workers at a recently opened hazardous waste disposal site. *J Exp Anal Environ Epidemiol* 1993; 3:1.
- Dominioni L, Dionigi R. Immunological function and nutritional assessment. *J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11:70S.
- Duprez V, Cornet V, Dautry-Varsat A. Down regulation of high affinity interleukin 2 receptors in human tumor T cell lines. *J. Biol. Chem* 1988; 263: 12860.

- Elinder C, Gerhardsson L, Oberdoerster G. Biological monitoring of toxic metals. En: Clarkson T, Fiberg L, Nordberg G, Sager P. *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Plenum Press New York 1987; 1.
- Ewers U, Stiller-Winkler R, Idel H. Serum immunoglobulin, complement C3, and salivary IgA levels in lead workers. *Environ Res* 1982; 29:351.
- Ferson M, Edwards A, Lind A, Milton G, Hersey P. Low natural-killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int J Cancer* 1979; 23:603.
- Goldsmith M, Lai S, Xu W, Amaral M, Kuczek E, Parent L, Mills G, Tarr K, Longmore G, Greene W. Growth signal transduction by the human interleukin 2 receptor requires cytoplasmic tyrosines of the  $\beta$  chain and non-tyrosines residues of the  $\gamma$  chain. *J. biol. chem.* 1995; 270: 21729.
- Gorodilova V, Mandrik E. Use of some immunological reactions in a study of immune response in persons presenting a high oncological risk. *Sov Med* 1978; 8:50.
- Goyer R. Toxic effects of metals. En: Casarett y Doull's. *Toxicology. The basic science of poisons*. Pergamon Press, USA 1991; 623-680.
- Harden D. The molecular basis for unherited susceptibility to and action of carcinogens. En: Volans G, Sims J, Sullivan F, Turner P. *Basic Science in Toxicology. Proceedings of the V International Congress of Toxicology*. Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia 1990; 7.
- Hausman P, Weksler M. Changes in the immune response with age. En: Finch C, Schneider E. *Handbook of the biology of aging*. New York, Van Nostrand Reinhold 1985: 414.
- Holt P, Keast D. Environmentally induced changes in immunological function: Acute and chronic effects of tobacco smoke and other contaminants in man and experimental animals. *Bacteriol Rev* 1977; 41:205.
- Hulka B, Wilcosky T, Griffith J. Biological markers in epidemiology. New York, Oxford University Press 1990: 1.
- International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metals and metallic compounds. IARC 1987; 23.
- International Agency for Research on Cancer. Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. Vainio H, MaGee P, McGregor D, McMichael A. IARC 1992.
- Izquierdo M, Reif K, Cantrell D. The regulation and function of p21 ras during T-cell activation and growth. *Immunol Today* 1995; 16:159.
- Jaremin B. Blast lymphocyte transformation (LTT), rosette (E-RFC) and leukocyte migration (MIF) tests in persons exposed to the action of lead during work. *Bull Inst Marit Trop Med Gdynia* 1983; 34:189.
- Kapsenberg M, Van der Pouw-Kraan T, Stiekema F, Schootemeijer A, Bos J. Direct and indirect nickel-specific stimulation of T lymphocytes from patients with allergic contact dermatitis to nickel. *Eur J Immunol* 1988; 18:977.
- Kastelan M, Gerencer M, Kastelan A, Gawulin S. Inhibition of mitogen and specific antigen-induced human lymphocyte proliferation by cadmium. *Exp Cell Biol* 1981; 49:15.
- Klasing K. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J Nutr* 1988; 18:1436.
- Klaus G, Hawrylowicz C. Cell-cycle control in lymphocyte stimulation. *Immunol Today* 1984; 5:15.
- Koller L. Immunotoxicity: Functional changes. En: Dayan A, Hertel R, Heseltine E, Kazantzis G, Smith E, van der Venne M. *Immunotoxicity of metals and immunotoxicology*. New York Plenum Press, USA 1990: 233.
- Kono T, Minami Y, Taniguchi T. The interleukin 2 receptor complex and signal transduction: role of the  $\beta$ -chain. *Sem. Immunol.* 1993; 5: 299.
- Kumas A, Moreau J, Gibert M, Thèze J. Internalization of interleukin 2 by high affinity IL-2 receptors is required for the growth of IL-2-dependent T cell lines. *J. Immunol.* 1987; 139: 3680.
- Lee T, Marcoti R, Park B. Effects of pesticides on human leukocyte functions. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 1979; 23:597.
- Lee T, Tanaka N, Lamb, Gilmer T, Barret J. Induction of gene amplification by arsenic. *Science* 1988; 241:79.
- Lew F, Tsang P, Holland J, Warner N, Selifoff I, Bekesi J. High frequency of immune dysfunctions in asbestos workers and in patients with malignant mesothelioma. *J Clin Immunol* 1986; 6:225.
- Lewis V, Twomey J, Bealmear P, Goldstein G, Good R. Age, thymic involution and circulating thymic hormone activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47:145.
- Luster M, Dean J, Moore J. Evaluation of immune functions in toxicology. En: Hayes A. *Principles and methods in toxicology*. New York Raven 1982: 561.
- Minami Y, Kono T, Miyasaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 245.

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65:55.
- Mosmann T, Cherwinski M, Bond M, Giedlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. Definition to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136: 2348.
- Mosmann T, Coffman R. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 1989; 7: 145.
- National Research Council. *Biological Markers in Reproductive Toxicology.* Commission on Life Sciences. NRC. National Academy Press, Washington D.C. 1989; 15.
- National Research Council, Subcommittee on Immunotoxicology Committee on Biologic Markers, National Academy Press, Washington D.C. 1992.
- Penn I. Tumors of the immunocompromised patients. *Ann Rev Med* 1988; 39:63.
- Peterson M, Smialowicz R, Harder S, Ketcham B, House D. The effect of controlled ozone exposure on human lymphocyte function. *Environ Res* 1981; 24:299.
- Petz L, Garratty G. *Acquired immune hemolytic anemias.* New York: Churchill Livingstone. 1980.
- Pezzini A, Riviera A, Paggiaro P, Spiazzi A, Gerosa F, Filieri M, Toma G, Tridente G. Specific IgE antibodies in twenty-eight workers with diisocyanate-induced bronchial asthma. *Clin Allergy* 1984; 14:453.
- Radford E. Sensitivity of health endpoints: Effects on conclusions of studies. *Environ Health Perspect* 1981; 42:45.
- Rao K, Schwartz S, Good R. Age-dependent effects of zinc on the transformation of human lymphocytes to mitogens. *Cell Immunol* 1979; 42:270.
- Reidenberg M, Drayer D. Procainamide, N-acetylprocainamide, antinuclear antibody and systemic lupus erythematosus. *Angiology* 1986; 37:968.
- Repine J, Fox R, Berger E. Dimethylsulfoxide inhibits killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immunology* 1981; 31:510.
- Robey E, Allison J. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today* 1995; 16:306.
- Rogers A, Newberne P. Nutrition and immunological responses. *Cancer Detect Prevent* 1987; 1:1.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*, Ed. Mosby, Barcelona, España 1996; 420.
- Santos M, De Sousa M. In vitro modulation of T-cell surface molecules by iron. *Cell Immunol* 1994; 154:498.
- Scott N, Hatleid K, MacKenzie N, Carter D. Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathion. *Chem Res Toxicol* 1994; 6:102.
- Stacey N. Effects of cadmium and zinc on spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 1986; 18:293.
- Stiller-Winkler R, Krämer U, Fielder E, Ewers U, Dolgner R. C3c concentrations in sera of persons living in areas with different levels of air pollutions in Northrhine-Westphalia. *Environ Res* 1989; 49:7.
- Swain S. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Curr Opin Immunol* 1991; 3:304.
- Thompson D. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem-Biol Interac* 1993; 88: 89.
- Thurman G, Siwns B, Goldstein A, Killian D. The effects of organic compounds used in the manufacture of plastics on the responsiveness of murine and human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978, 44:617.
- Twomey J. *The pathophysiology of human immunologic disorders.* Baltimore: Urban and Schwarzenberg 1982: 269.
- Urnab T, Jarstrand C. Selenium effects on human neutrophilic granulocyte function in vitro. *Immunopharmacology* 1986; 12:167.
- Vahter M. Arsenic. En: Clarkson T, Fiberg L, Nordberg G, Sager P. *Biological Monitoring of Toxic Metals.* Plenum Press, New York 1988.
- Vos J. Immunotoxicity assessment: screening and function studies. *Arch Toxicol* 1980; 5:67.
- Wagnerová M, Wagner V, Mádlo Z, Zavázal V, Wokounová D, Kriz J, Mohyla O. Seasonal variations in the levels of immunoglobulins and serum proteins of children differing by exposure to air-borne lead. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1986; 30:127.
- Walder B, Robertson M, Jeremy D. Skin cancer and immunosuppression. *Lancet* 1971; 11:2109.
- Ward P, Goldschmidt P, Greene N. Suppressive effects of metal salts on leukocyte and fibroblastic functions. *J Reticuloendoth Soc* 1975; 18:313.
- Warren C, Holford V, Wong C, Manfreda J. The relationship between smoking and total immunoglobulin E levels. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69:370.



Watson R. Ethanol: Immunomodulation and cancer. *Prog Food Nutr Sci* 1988; 12:189.

Weinberg K, Parkman R. Severe immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. *New Eng J Med* 1990; 322:1718.

Wild C. Antibodies to DNA alkylation as analytical tools in chemical carcinogenesis. *Mutat Res* 1990; 233:219.

Wolfe J, Ross D, Cohen G. A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. *FEBS letters* 1994; 352:58.

World Health Organization. Arsenic. *Environmental Health Criteria*. WHO 1981.