

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



TITULO
"EFECTO DE LA INTOXICACION CRONICA CON
ARSENICO SOBRE DIFERENTES MECANISMOS
INMUNITARIOS EN RATONES BALB/c Y EN LAS
CARACTERISTICAS DE LA GIARDIOSIS MURINA"

POR M.C. CLAUDIA ESCUDERO LOURDES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Médica

M.C. CLAUDIA ESCUDERO LOURDES

TD
QH545
.A77
E8
c.1

2002

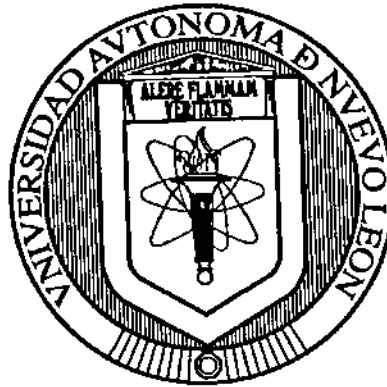


1080113113

0095-87860

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



TITULO

"EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON ARSÉNICO SOBRE DIFERENTES
MECANISMOS INMUNITARIOS EN RATONES BALB/c Y EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LA
GIARDIOSIS MURINA"

POR M.C. CLAUDIA ESCUDERO LOURDES

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en

Microbiología Médica

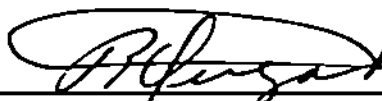
ENERO 2002

15
04
177
E2
C-1



**"EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON ARSÉNICO SOBRE DIFERENTES
MECANISMOS INMUNITARIOS EN RATONES BALB/c Y EN LAS CARACTERÍSTICAS
DE LA GIARDIOSIS MURINA"**

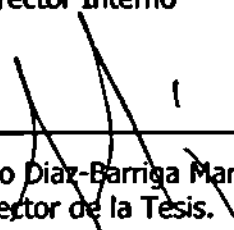
Aprobación de la Tesis:



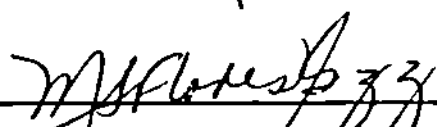
Dr. Roberto Quezada Calvillo
Director externo



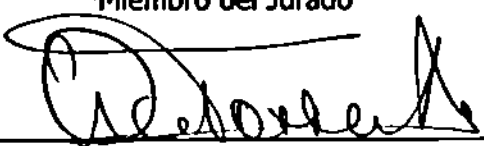
Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza
Director Interno



Dr. Fernando Diaz-Barriga Martínez
Codirector de la Tesis.

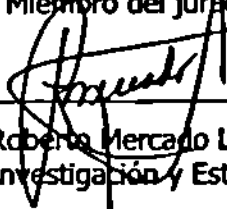


Dra. Socorro Flores Castañeda
Miembro del Jurado



Dr. Med Oscar Torres Alanís
Miembro del Jurado

Dr. Med. Lourdes Garza Ocañas
Miembro del jurado.



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado.

**"EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON ARSÉNICO SOBRE DIFERENTES
MECANISMOS INMUNITARIOS EN RATONES BALB/c Y EN LAS CARACTERÍSTICAS
DE LA GIARDIOSIS MURINA"**

Presentado por

M.C. Claudia Escudero Lourdes

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.S.L.P. bajo la asesoría interna del Dr Carlos Eduardo Medina de la Garza de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., la asesoría externa del Dr Roberto Quezada Calvillo y la coasesoría del Dr. Fernando Diaz-Barriga Martínez del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la U.A.S.L.P.



Dr. Roberto Quezada Calvillo
Director externo



Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza
Director Interno



Dr. Fernando Diaz-Barriga Martínez
Codirector de la Tesis.

RESUMEN

M.C. Claudia Escudero Lourdes

Fecha de Graduación:
31 de Enero del 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del estudio:

“EFECTO DE LA INTOXICACIÓN
CRÓNICA CON ARSÉNICO SOBRE
DIFERENTES MECANISMOS
INMUNITARIOS EN RATONES BALB/c Y
EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LA
GIARDIOSIS MURINA”

Número de páginas

133

Área de Estudio: Microbiología Médica

Candidato para la obtención del grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en
Microbiología Médica.

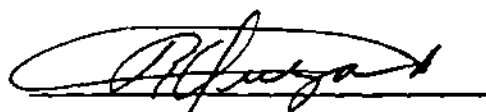
Propósito y Método de Estudio.

Los efectos tóxicos del As y sus compuestos han sido conocidos desde tiempos ancestrales, sin embargo un efecto adicional del As que ha sido reconocido recientemente, es su capacidad inmunotóxica. Los diferentes estudios realizados sobre sus propiedades inmunotóxicas, han llevado a conclusiones variadas, las cuales sugieren que el As posee un carácter inmunosupresor, así como inmunopotenciador. Estas observaciones, que aparentemente muestran efectos contradictorios del As sobre el sistema inmune, han sido descritas en forma independiente y realizadas en diferentes modelos experimentales. Adicionalmente, estos efectos parecen estar influenciados por la ruta, dosis y tiempo de exposición (crónico o agudo) del hombre o los animales de experimentación utilizados. En el presente trabajo se realizó la evaluación integral del efecto de la intoxicación oral crónica con NaAsO_2 en ratones de la cepa BALB/c sobre diferentes mecanismos de protección inmune y sobre la capacidad de eliminación de la infección gastrointestinal causada por *Giardia muris*.

Contribuciones y Conclusiones:

Nuestros resultados muestran que la ingestión crónica oral de NaNO_2 por ratones BALB/c causa alteraciones en algunas funciones del sistema inmune. Este efecto puede definirse con inmunomodulador ya que induce tanto inhibición como estimulación de diferentes funciones inmunitarias. Estas alteraciones dependen de la concentración de NaAsO_2 utilizada para intoxicar a los ratones y al parecer depende también del órgano o tejido inmune estudiado. Adicionalmente, la intoxicación de ratones con 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NaAsO_2 , mostró cambios en las características de la infección giardiósica, consistentes en una mayor variabilidad en la magnitud de excreción de quistes en heces y en la eliminación prematura de la infección, quizá como un reflejo de alteraciones tanto Inmunes como fisiológicas causadas por el tóxico.

FIRMA DE LOS ASESORES.



Dr. Roberto Quezada Calvillo



Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza.

*Con amor a quienes son mi más grande motivación y alegría:
Alfonso, Claudia Alejandra, Daniela y Larissa.*

Agradezco profundamente

.....A Dios, por darme la oportunidad de realizarme como profesionalista, esposa y madre .

.....A Alfonso, compañero de mi vida y amigo; a nuestras niñas Ale, Dany y Lari...

.....A mi madre, por entregar su vida en cada instante para ayudarme a alcanzar mis sueños.

.....A mis hermanos: Gaby y Carlos, Cuquita y Juan, Chelo y Memo, Pita y Ernesto, Pepe y Marilú y a Julián.

.....A Mary por ser la tía, la mamá, la compañera, la niñera, el paño de lágrimas, la consejera, la enfermera y la mejor amiga.

.....A la Sra. Cuca y el Sr. Pepe por su cariño y apoyo incondicional.

.....A mis amigos: Grecia, Rocío, Maricela, Mary Carmen y Edgar, Ana Cristina, y Alejandro, Liz Reynaga, Carmelita, Diana, Agripina, Paco, Paty, Lili, Alejandra, Alma (1) y Alma (2), Liz y Lalo.

.....Al Clan de bohemios sindicalizados: Norma y Humberto, Javier y Josefina, Rosita y Roberto, Esperancita y Javier y a Juan Manuel.

.....Al Dr. Fernando Diaz Barriga, al Dr. Roberto González Amaro, al Dr. Víctor Saavedra, a mis asesores Carlos Medina (la bata voladora) y Roberto Quezada y a los Drs. Oscar Torres Alanís, Lourdes Garza Ocañas y Socorro Flores Castañeda por todo su apoyo.

..... De manera muy especial a mi entrañable amigo Marco, por tantas y tantas cosas.....

INDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONTAMINANTES AMBIENTALES Y SU EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNE.	2
1.1.1 Inmunotenciación inducida por sustancias químicas y metales resultantes en reacciones alérgicas.	3
1.1.2 Inmunosupresión	4
1.1.2.1 Benceno	4
1.1.2.2 Hidrocarburos halogenados aromáticos	5
1.1.2.3 Hidrocarburos Policíclicos aromáticos	5
1.1.2.4 Uretanos y diésteres de forbol	6
1.1.2.5 Plaguicidas	6
1.1.2.6 Gases y partículas suspendidas en el aire	6
1.1.2.7 Metales presentes en el aire	7
1.2 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN PAÍSES EN VÍAS DE DESARROLLO.	8
1.3 CONTAMINANTES DE LA INDUSTRIA METALÚRGICA EN SAN LUIS POTOSÍ.	10
1.4 INMUNOTOXICIDAD DEL As.	11
1.5 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS TÓXICOS AMBIENTALES SOBRE EL SISTEMA INMUNE.	14
1.5.1 Histopatología	16
1.5.2 Inmunidad celular	16
1.5.3 Inmunidad humoral	17
1.5.4 Macrófagos	17
1.5.5 Granulocitos	17
1.5.6 Capacidad para eliminar infecciones	18

1.6 RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS HACIA TÓXICOS Y FÁRMACOS .	18
1.7 GIARDIOSIS COMO UN MODELO PARA EVALUAR INMUNOTOXICIDAD.	21
1.8 EL GÉNERO <i>Giardia</i> .	22
1.8.1 Manifestaciones clínicas de la giardiosis	23
1.8.2 Patogenia y respuesta inmune	24
1.9 JUSTIFICACIÓN.	27
1.10 OBJETIVO GENERAL.	28
1.11 OBJETIVOS PARTICULARES.	28
2. MATERIAL Y METODOS	29
2.1 ANIMALES UTILIZADOS Y TRATAMIENTOS.	29
2.2 OBTENCIÓN DE TEJIDOS, ÓRGANOS Y CÉLULAS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	30
2.2.1 Obtención de bazo y CMN.	30
2.2.2 Obtención de Intestino.	31
2.2.3 Obtención de sangre, suero y células PMN.	31
2.2.4 Células peritoneales.	32
2.3 DETERMINACIÓN DE As EN ÓRGANOS.	30
2.4 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	34
2.5 PROLIFERACIÓN DE CMN DE BAZO	35
2.6 PRODUCCIÓN DE OXIDO NITRICO (NO) POR MONOCITOS Y MACRÓFAGOS PERITONEALES.	36
2.7 ESTALLIDO RESPIRATORIO POR NEUTRÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA.	37
2.8 CONCENTRACIÓN DE IgG SÉRICA TOTAL.	38
2.9 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS CONTRA OVOALBÚMINA.	39
2.10 INFECCIÓN DE RATONES, AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE QUISTES DE <i>G. muris</i>	40

2.11	DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE QUISTES Y TROFOZOÍTOS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	39
2.12	INMUNOSUPRESIÓN CON FOSFATO DE DEXAMETASONA	43
2.13	CEPAS DE <i>G. lamblia</i> UTILIZADAS.	43
2.14	CULTIVO DE TROFOZOÍTOS DE <i>G. lamblia</i> .	44
2.14.1	Medio TYI-S-33 completo para el cultivo de <i>G. lamblia</i> .	44
2.14.2	Cultivo y subcultivo de trofozoitos de <i>G. lamblia</i>	45
2.14.3	Solución estándar de NaAsO ₂	45
2.15	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
3.	RESULTADOS	47
3.1	EFFECTO DE LA INTOXICACIÓN CON As SOBRE LOS MECANISMOS INMUNITARIOS	47
3.1.1	Determinación de As en órganos.	47
3.1.2	Efecto de la intoxicación crónica con As sobre mecanismos Inmunitarios.	50
3.1.2.1	Patología.	50
3.1.2.1.1	Efecto del As sobre peso corporal y la relación peso del bazo/peso corporal.	50
3.1.2.1.2	Análisis Histopatológico del efecto del As sobre el tejido linfoide.	54
	• Histología del Timo.	54
	• Histología esplénica.	56
3.1.2.2.	Inmunidad celular.	58

3.1.2.2.1 Efecto de la intoxicación con As sobre la proliferación de CMN.	58
3.1.2.2.2 Efecto de la intoxicación con As sobre la producción de NO por macrófagos peritoneales.	61
3.1.2.2.3 Efecto de la intoxicación con As sobre la capacidad de los neutrófilos para realizar estallido respiratorio.	63
3.1.2.3 Inmunidad Humoral.	65
3.1.2.3.1 Determinación del efecto de la intoxicación con As sobre la producción de IgG total	65
3.1.2.3.2 Producción de anticuerpos IgG específicos contra ovoalbúmina.	67
3.2 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON As SOBRE LA GIARDIOSIS MURINA.	69
3.2.1 Giardiosis aguda	69
3.2.2 Giardiosis crónica	71
3.2.3 Efecto de inmunosupresión inducida por esteroides sobre la infección primaria.	73
3.2.4 Reactivación de la infección.	75
3.2.5 Efecto del As sobre la giardiosis murina.	77
3.2.5.1 Giardiosis primaria.	77
3.2.5.2 Giardiosis secundaria.	80
3.3 DETERMINACION DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN in vitro DE <i>G. lamblia</i> A NaAsO ₂	82
3.3.1 Patrón de crecimiento de los trofozoítos <i>G. lamblia</i> cepas P1 y WB.	82
3.3.2 Validación del método para determinar viabilidad en los trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	85

3.1.2.2.1 Efecto de la intoxicación con As sobre la proliferación de CMN.	58
3.1.2.2.2 Efecto de la intoxicación con As sobre la producción de NO por macrófagos peritoneales.	61
3.1.2.2.3 Efecto de la intoxicación con As sobre la capacidad de los neutrófilos para realizar estallido respiratorio.	63
3.1.2.3 Inmunidad Humoral.	65
3.1.2.3.1 Determinación del efecto de la intoxicación con As sobre la producción de IgG total	65
3.1.2.3.2 Producción de anticuerpos IgG específicos contra ovoalbúmina.	67
3.2 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON As SOBRE LA GIARDIOSIS MURINA.	69
3.2.1 Giardiosis aguda	69
3.2.2 Giardiosis crónica	71
3.2.3 Efecto de inmunosupresión inducida por esteroides sobre la infección primaria.	73
3.2.4 Reactivación de la infección.	75
3.2.5 Efecto del As sobre la giardiosis murina.	77
3.2.5.1 Giardiosis primaria.	77
3.2.5.2 Giardiosis secundaria.	80
3.3 DETERMINACION DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN in vitro DE <i>G. lamblia</i> A NaAsO₂	82
3.3.1 Patrón de crecimiento de los trofozoítos <i>G. lamblia</i> cepas P1 y WB.	82
3.3.2 Validación del método para determinar viabilidad en los trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	85

3.3.3 Efecto del As sobre el patrón de crecimiento de <i>G. lamblia</i> .	87
3.3.4 Efecto del As sobre las fases metabólicas de crecimiento de <i>G. lamblia</i> .	93
3.3.5 Efecto de la exposición crónica con As sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i> .	95
4. DISCUSION	97
4.1 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON AS SOBRE LOS MECANISMOS INMUNITARIOS.	98
4.2 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON AS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA GIARDIOSIS MURINA.	100
4.3 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE <i>G. lamblia</i> A NaAsO ₂ <i>in vitro</i> .	103
4.3.1 Efecto de la exposición a arsénico sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i> .	104
4.3.2 Mecanismos de resistencia microbiana a los tóxicos ambientales.	106
4.3.3. Mecanismos de resistencia en <i>Giardia</i> .	108
5. CONCLUSIONES	111
5.1 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA ORAL CON AS SOBRE LOS MECANISMOS DE DEFENSA Y LA GIRADIOSIS MURINA.	111
5.2 EFECTO DEL AS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE <i>G. lamblia</i> .	112
5.3 PERSPECTIVAS DE TRABAJO.	112
6. REFERENCIAS	114

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto de la intoxicación con As sobre el peso corporal de ratones.	51
2	Histología tímica de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO ₂	55
3	Histología esplénica de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO ₂ .	57
4	Indice de proliferación de CMN de bazo de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO ₂ .	60
5	Indice de producción de NO por macrófagos peritoneales de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO ₂ .	62
6	Intensidad de fluorescencia media celular producida por efecto del estallido respiratorio de células PMN obtenidas de sangre periférica de ratones intoxicados con NaAsO ₂ .	64
7	Niveles relativos de IgG sérica total en el suero de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO ₂ .	66
8	Niveles relativos de IgG sérica específica anti-ovoalbúmina medidos tras inmunización con ovoalbúmina en ratones BALB/c intoxicados con 125 y 250 µg/mL de NaAsO ₂ .	68
9	Patrón de excreción de quistes en el modelo de infección con <i>G. muris</i> en la cepa de ratones BALB/C.	70
10	Patrón de excreción de quistes en el modelo de infección con <i>G. muris</i> en la cepa de ratones CBA/CaHN (x ¹⁰).	72
11	Efecto de Inmunosupresión inducida por dexametasona en ratones infectados con <i>G. muris</i> .	74
12	Reactivación de la infección causada por <i>G. muris</i> en ratones BALB/c tras la inoculación intraperitoneal de 100 µg de dexametasona posterior al cese de excreción de quistes de la infección primaria.	76
13	Patrones de excreción de quistes de <i>G. muris</i> de ratones BALB/c intoxicados con diferentes concentraciones de NaAsO ₂ .	79
14	Efecto de la intoxicación con As sobre la giardiosis secundaria.	81

15	Patrón de crecimiento de la cepa P1 de <i>G. lamblia</i> .	84
16	Validación del método para la determinación de la viabilidad de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	86
17	Patrón de crecimiento de <i>G. lamblia</i> en presencia de 10-200 µg/mL de NaAsO ₂ en el medio de cultivo TYI-S-33.	88
18	Patrón de crecimiento de <i>G. lamblia</i> en presencia de 250-1000 µg/L de NaAsO ₂ en medio de cultivo TYI-S-33.	90
19	Curva dosis-respuesta del efecto de NaAsO ₂ sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>G. lamblia</i> .	92
20	Efecto de la exposición <i>in vitro</i> a NaAsO ₂ sobre la fase logarítmica y fase estacionaria de crecimiento de la cepa P1 de <i>G. lamblia</i> .	94
21	Reversibilidad del efecto inhibitorio de NaAsO ₂ sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i> .	96

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Panel TIER I Y TIER II para la detección de alteraciones inmunes tras la exposición a sustancias químicas y fármacos en roedores.	15
2	Concentración de As en tejidos de ratones intoxicados con NaAsO ₂	49
3	Relación del peso del bazo Vs peso corporal en ratones intoxicados con NaAsO ₂	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
CMN	Células Mononucleares
DEP	Diesel exhaust partides
g	gramo
IgG	Inmunoglobulina G
IgE	Inmunoglobulina E
IgA	Inmunoglobulina A
IgM	Inmunoglobulina M
LPS	Lipopolisacárido
L	Litro
mL	Mililitro
mM	Micromolar
min	Minuto
µg	Microgramo
µL	Microlitro
n	Número de muestra
ng	Nanogramo
Con A	Concanavalina A
PWM	Fitoloca Americana
pH	Potencial de Hidrógeno
PMA	Ester forbólico del ácido Mirístico
PHA	Fitohemaglutinina

PBS	Amortiguador salino de Fosfatos
MTS	(3-(4-5 dimetilthiazol-2il-5 (3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfoenil)-2 H tetrazolina) Reactivo de Owen.
ME	Mercapto etanol
PMN	Polimorfonucleares
PMS	Metasulfato de Fenazina (Phenazine methasulfate)
SBF	Suero Bovino Fetal
LT	Linfocitos T
LB	Linfocitos B
LTh	Linfocitos T de ayuda
LTc	Linfocitos T citotóxico
NK	Natural Killers (Asesinas Naturales)
FDA	Food and Drug Administration
EPA	Environment Protection Agency
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

CAPITULO

1

INTRODUCCIÓN

Las *enfermedades ambientales* son causadas por diversos factores ambientales como son agentes químicos, radiación, ó por fenómenos físicos. Se ha reconocido que la exposición a contaminantes y tóxicos ambientales afecta la salud del hombre, su calidad de vida y el funcionamiento natural de los ecosistemas que lo rodean. Aunque la presencia de algunos contaminantes ambientales es el resultado de procesos naturales, la mayoría de los contaminantes ambientales encontrados a concentraciones tóxicas son producidos durante las diferentes actividades humanas. La intensa actividad industrial ha incrementado la exposición del hombre a múltiples compuestos químicos presentes en altas concentraciones en el ambiente. Ejemplos de estos químicos son materiales inorgánicos como el Pb, el Hg, el As, Cd y asbesto, así como sustancias orgánicas como los bifenilos policlorinados (PBCs), cloruro de vinilo y el pesticida DDT (dicloro difenil tricloroetano).

Los efectos de la exposición a dichos tóxicos, tanto en ambientes naturales como laborales, están influenciados por las dosis, rutas y períodos de exposición. De importancia especial es el potencial tardío de algunos compuestos químicos liberados al ambiente para producir neoplasias en el hombre, como son los casos del carcinoma

pulmonar y el mesotelioma causado por exposición continua a asbestos, el carcinoma hepático causado por el cloruro de vinilo y la leucemia causada por exposición al benceno (Dean y col., 1986). Sin embargo, aún no ha sido probada la totalidad del potencial tóxico de la mayoría de los químicos ambientales.

Las enfermedades humanas producidas por efecto de la exposición a contaminantes ambientales se deben a su efecto sobre diversos tejidos y sistemas del cuerpo (Bekesi y col. 1986) . La piel, los pulmones, el hígado, los riñones, el sistema nervioso y el sistema inmune, son blancos potenciales de los efectos de diferentes agentes, en diferentes condiciones. Muchos compuestos ambientales son particularmente importantes dada su capacidad para causar diversos efectos sobre los mecanismos de defensa inmunológica ya que, entre otros efectos, podrían incluir una mayor susceptibilidad para la adquisición de enfermedades infecciosas o alteraciones en la capacidad de eliminación de las mismas.

1.1 CONTAMINANTES AMBIENTALES Y SU EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Como consecuencia de la industrialización , la exposición humana a tóxicos ambientales se ha incrementado, ocasionando un aumento en la probabilidad de aparición de alteraciones de los diferentes mecanismos inmunitarios. Por ello, actualmente, la exposición a tóxicos ambientales se presenta como uno de los problemas potenciales de salud más preocupantes.

En general, los efectos de la exposición a diversos tóxicos ambientales sobre el sistema inmune podrían ser agrupados en efectos de inmunopotenciación y efectos de inmunosupresión.

1.1.1 Inmunopotenciación inducida por sustancias químicas y metales, resultantes en reacciones alérgicas.

Los trabajadores de industrias así como los individuos que viven cerca de ellas están expuestos a diversas sustancias y materiales tóxicos que pueden provocar asma, hipersensibilidad y dermatitis de contacto (Baer y col., 1973; Druet y col., 1982; Parker, 1982) mismos que tienen su origen en efectos adversos sobre diferentes mecanismos del sistema inmune. La prevalencia de asma y otras enfermedades alérgicas se han incrementado considerablemente en todas las ciudades industrializadas. Al parecer, tanto factores genéticos como ambientales son responsables de este aumento en la prevalencia. Entre los factores ambientales que se considera son los responsables más importantes se encuentran la contaminación del aire y el cambio de estilo e vida, así como una baja resistencia a las infecciones febriles durante la niñez (Aubier, 2000). Varios estudios experimentales han mostrado que algunos contaminantes como el ozono o las partículas producidas por combustión de diesel (Diesel Exhaust Particles, DEP) pueden interactuar con alergenos, amplificando sus reacciones alérgicas (Neuhaus-Steinmetz y col., 2000; Aubier M, 2000). Además, se ha observado que las DEP administradas a ratones intraperiotneal o intranasalmente poseen un efecto adyuvante en la producción de IgE. Así mismo, se ha descrito que la concentración de IgE total y específica así como células que expresan IgE en su

superficie en lavados nasales de humanos expuestos a DEP se encuentra aumentada (Takafuji y col., 2000). Se cree que este aumento se debió a la estimulación de la síntesis de citocinas de tipo Th2 inducida por el reto nasal con DEP, que ha sido observado tanto en el hombre como en los ratones (Takafuji y col., 2000). Por otro lado, ha sido demostrado que el metanol presente en las DEP induce apoptosis y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en macrófagos pulmonares alveolares, probablemente debido a una inducción de disfunción mitocondrial (Hiura y col., 2000). Otras sustancias químicas, como plásticos, resinas, productos usados para el terminado de textiles, cosméticos y algunos metales han sido también implicados en muchas respuestas de hipersensibilidad en el hombre (Dean y col., 1986).

1.1.2 Inmunosupresión.

Son diversos los compuestos a los que el hombre está expuesto tanto laboral como naturalmente y a los cuales se les atribuyen efectos negativos sobre diferentes mecanismos de respuesta inmunitaria.

1.1.2.1 Benceno.

La exposición a benceno, se ha asociado a mielotoxicidad manifestada como leucopenia, pancitopenia ó anemia involucrando a uno o más de los elementos celulares inmunes. En individuos ocupacionalmente expuestos a benceno se ha reportado una fuerte correlación entre linfocitopenia y la existencia de anomalías en diferentes parámetros inmunológicos como disminución en los niveles séricos de

complemento y de IgG e IgA. (Dean y col., 1986). Además, se ha reportado que la hidroquinona, un metabolito reactivo del benceno, provoca la inhibición de la activación tanto de linfocitos T como B estimulados con mitógenos (Pyatt y col., 1998).

1.1.2.2 Hidrocarburos halogenados aromáticos.

La exposición tanto ocupacional como experimental a Bifenilos polibrominados (PBBs) y policlorinados (PBCs) y a las dibenzodioxinas se ha asociado con disfunciones inmunitarias tanto de mecanismos mediados por células como por anticuerpos (Nordstrom y col., 2000; Warren y col., 2000; Kronenberg y col., 2000). Adicionalmente, la exposición a estos compuestos causa una disminución en la resistencia del huésped al reto con agentes infecciosos como bacterias, parásitos y virus, así como con células tumorales (Nordestrom y col., 2000; Dean y col., 1986).

1.1.2.3 Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH).

La exposición a PAH producidos durante la ignición de combustibles fósiles, ha sido asociada a alteraciones importantes en los mecanismos de defensa inmunes mediados tanto por células como humorales. Sin embargo, la inmucompetencia mediada por linfocitos T parece ser poco alterada por la exposición a estos compuestos en comparación a las alteraciones observadas en la inmunidad humoral.

1.1.2.4 Uretanos y diesteres de forbol.

La exposición humana ocupacional, así como la exposición experimental de animales a los uretanos y a diesteres de forbol, inducen la aparición de linfomas, leucemias adenomas pulmonares, hepatomas y melanomas. Parte de los efectos carcinogénicos de uretanos y diesteres de forbol se han adjudicado a la depresión de diversos parámetros inmunes, tales como respuestas proliferativas de los linfocitos B y T a estímulos inespecíficos o con leucocitos alogénicos, la disminución de la actividad de células NK y disminución del número de linfocitos T (Dean y col., 1983).

1.1.2.5 Plaguicidas.

Existe evidencia que implica a los insecticidas organofosforados, carbamatos y organoclorados en la producción de alteraciones en los mecanismos de resistencia tanto en humanos como en animales de laboratorio (Nordstrom y col., 2000; Dean y col., 1986). Por ejemplo, la exposición de conejos a 1.5 mg/kg/día de metilparatión por vía oral durante 28 días, produce una marcada reducción en los centros germinales del bazo después de estimulación antigénica, atrofia tímica cortical y disminución de la hipersensibilidad tardía a la prueba con tuberculina (Street y col., 1974).

1.1.2.6 Gases y partículas suspendidas en el aire.

Los pulmones constituyen el órgano blanco primario para el ataque por químicos y tóxicos que se encuentran en el aire. Por ello, este órgano es altamente vulnerable a una amplia variedad de sustancias que causan daño a los tejidos involucrados en el

intercambio de gases y en sus mecanismos de defensa. La exposición a ozono puede inducir inmunoestimulación, causando un fenómeno alérgico o bien una inmunosupresión manifestada por un incremento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Lacroix y col., 1998). Debido a que los macrófagos alveolares son las primeras células involucradas en la resistencia pulmonar a agentes tóxicos, el ozono presente en el aire altera particularmente la función de estas células. Varios estudios demuestran que la exposición a ozono en animales de laboratorio, aún a concentraciones tan bajas como 0.1 ppm, induce una alteración en el perfil de citocinas producidas por los macrófagos alveolares, lo cual se asocia a un aumento en la susceptibilidad para la adquisición de enfermedades infecciosas respiratorias en estos animales (Cohen y col., 2001; Coffin y col., 1972). Otras células involucradas en la defensa contra agentes tóxicos e infecciosos parecen ser también afectadas por la exposición al ozono. Se ha reportado que ratones de la cepa BALB/c expuestos a diferentes dosis de ozono, muestran respuestas de linfocitos T de tipo Th2 asociadas a un incremento de la concentración de IgE sérica total, en los niveles de IL-4 e IL-5 y el reclutamiento de eosinófilos y linfocitos en las vías aéreas, de una manera dependiente de la dosis de ozono (Neuhaus-Steinmetz y col., 2000).

1.1.2.7 Metales presentes en al aire.

Existe evidencia indicando que varios metales traza pueden alterar la función macrofágica y causar un incremento significativo en la susceptibilidad a las infecciones. Entre los metales que se ha descrito que tienen estos efectos son Ni, Cd, Zn y Mg (Dean y col., 1986).

La exposición sistémica a compuestos químicos derivados de metales también puede causar efectos adversos sobre los mecanismos de protección inmune y alterar la resistencia tanto a agentes infecciosos como al desarrollo de tumores (Adkins y col., 1979; Dean y col., 1982a). Estos efectos han sido reportados principalmente para Pb, Cd (Borella y col., 1991), mercurio orgánico ó inorgánico, organotiones y otros metaloides como As, Ni y Zn. Por ejemplo, la exposición a Pb tiene efectos deletéreos tanto sobre los mecanismos Inmunitarios mediados tanto por células como humorales (Fischbein y col., 1993; Borella y col., 1991). Estas alteraciones se ven reflejadas en la capacidad del hospedero para resistir el reto con diferentes agentes infecciosos tanto de tipo viral como bacteriano (Dean y col., 1986).

1.2 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN PAISES EN VIAS DE DESARROLLO.

En los países en vías de desarrollo los efectos de los tóxicos ambientales sobre la salud del hombre son potenciados por otros factores como una alta prevalencia de desnutrición y de enfermedades infecciosas, que afectan tanto a individuos de las áreas rurales como urbanas. Por ello en estos países los tóxicos ambientales representan un problema todavía mayor que en los países desarrollados. Además, la carencia o mala aplicación de normas que regulan la exposición del hombre a sustancias genotóxicas, es un problema común.

La desnutrición es problema de salud común en nuestro país. Se conoce que las deficiencias primarias en vitamina A, yodo, calcio , ácido fólico y elementos traza como el zinc, se ven agravadas por exposición a diversos contaminantes producidos por la actividad humana (Iyengar y col., 2000). Por ejemplo el Pb, el As, Hg y otros metales

pesados presentes en el ambiente y que pueden entrar a la cadena alimenticia, pueden ser una causa seria de depleción de las reservas corporales de hierro, vitamina C y otros nutrientes esenciales. Esto da lugar a un deterioro de los mecanismos inmunitarios, retardo en el crecimiento intrauterino, alteraciones en las facultades psico-sociales y otros trastornos asociados a malnutrición.

En México, la rápida industrialización carente de un control ambiental adecuado, ha causado una alta contaminación de aire, suelo y agua por metales en diferentes comunidades, sobre todo en aquellas en donde se localizan industrias refinadoras y fundidoras de metales. El As es uno de los metaloides más comúnmente encontrado como contaminante ambiental tanto en agua, aire y suelo, en diferentes zonas del centro de México. Este metaloide es un producto de procesos de refinación de metales, por lo que, las comunidades aledañas a las industrias refinadoras presentan altas concentraciones ambientales de As que superan en mucho a las normas ambientales establecidas. Diferentes estudios han mostrado que Hermosillo, Son., la región Lagunera de Durango, Torreón, Coah., el estado de Chihuahua, Monterrey, N.L y la ciudad de San Luis Potosí, presentan altos índices de contaminación por Cd, Pb y As (Benin y col., 1999; Díaz Barriga y col., 1992, 1994). De igual manera se han reportado altas concentraciones de Pb, Cr y Ni en sedimentos y tejidos animales en estados de las costas del Pacífico Mexicano y el Golfo de México, principalmente en la cercanía de ciudades altamente industrializadas (Villanueva y col., 1998).

1.3 CONTAMINANTES DE LA INDUSTRIA METALURGICA EN SAN LUIS

POTOSI.

La fracción Morales de la zona urbana de la ciudad de San Luis Potosí, alberga a la compañía Industrial Minera México, S.A. (IMMSA), quien cuenta con plantas refinadoras de cobre y de zinc. En conjunto, esta compañía emplea a poco mas de 1700 trabajadores y constituye la tercera fuente de empleo mas importante de la ciudad. Entre los productos de la compañía IMMSA se encuentran Pb, Cd y As, con una producción de alrededor de 5000, 1400 y 4800 toneladas anuales, respectivamente, correspondientes a alrededor del 3%, 45% y 100% de la producción nacional, respectivamente. Desafortunadamente, la alta actividad metalúrgica dentro de esta área urbana ha causado la presencia de concentraciones alarmantemente altas de dichos minerales, como contaminantes de suelo, aire y agua. Estudios realizados por el grupo de Toxicología Ambiental de la Facultad de Medicina de la UASLP (Díaz-Barriga y col., 1994), han mostrado que el valor promedio de As en muestras de aire durante los meses de octubre a marzo de los años de 1989 hasta 1993, fue de 2.4 mg/m^3 . Este valor es entre 25 y 70 veces mas alto que el indicado por la guía ambiental (0.05 mg/m^3) y está muy por arriba de las normas anuales establecidas para los estados norteamericanos de Washington (0.3 mg/m^3) o Montana (0.07 mg/m^3). Así mismo, la concentración de As en agua mostró cifras de hasta el 200% superiores las recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como máximo aceptable (10 mg/L). La concentración de As en muestras de suelo fue de hasta 880 mg/kg , que corresponde a mas de 15 veces los valores de la guía ambiental (56 mg/kg). En lo referente a Pb, la concentración promedio en aire y suelo del área de la fracción Morales durante 1989 a 1993 fue de 2.4 mg/m^3 y 357 mg/kg , respectivamente, los que

están también muy por arriba de los valores recomendados por la OMS de 1 mg/m³ para aire, o de la guía ambiental en suelo de 250 mg/kg (Díaz- Barriga y col., 1994). Además de la fracción Morales, dentro del estado de San Luis Potosí existen al menos otras cinco áreas en donde la alta actividad minero-metalúrgica ha causado la presencia de altas concentraciones de metales como contaminantes ambientales.

En niños que habitan la mencionada zona se han reportado niveles significativamente altos de As en orina (un promedio de 191.1 µg de As/g de creatinina), en asociación a una alta prevalencia de infecciones gastrointestinales por diversos agentes entre los que destaca *Giardia lamblia* (Díaz-Barriga y col., 1992). Esta asociación nos sugiere que la exposición crónica de los habitantes de estas zonas a los contaminantes mencionados, puede ser una de las causas de una mayor susceptibilidad para la adquisición de estas infecciones, probablemente mediante efectos deletéreos sobre los mecanismos de protección inmune .

1.4 INMUNOTOXICIDAD DEL As.

La exposición aguda y crónica a As ha sido reportada en muchos países del mundo, especialmente en Argentina, Bangladesh, India, México, Tailandia y Taiwán, en donde una gran proporción del agua para beber está contaminada con altas concentraciones de As (Tchounwou y col., 1999). Los efectos generales sobre la salud del hombre por exposición a As incluyen efectos cardiovasculares y enfermedad vascular periférica, anomalías del desarrollo, desordenes neurológicos y neuroconductuales, diabetes, pérdida del sentido del oído, fibrosis portal hepática, fibrosis pulmonar, desordenes hematológicos como anemia, leucopenia, eosinofilia así como neoplasias (Tchounwou y

col., 1999). Sin embargo, en los últimos años un efecto indeseable más del As se añade a la lista anterior: su efecto sobre diferentes mecanismos inmunitarios. Los efectos que se han reportado que causa la exposición a As sobre el sistema inmune, podrían ser divididos en Inmunoestimulación e inmunosupresión . Estos efectos aparentemente contradictorios han sido descritos en forma independiente y parecen estar influenciados por la ruta, dosis y tiempo de exposición (crónico o agudo) del hombre o los animales de experimentación utilizados en los estudios de inmunotoxicidad. Por ejemplo, se ha reportado que la administración intratraqueal de As a una dosis de 200 mg/kg a ratones, disminuye la resistencia al desarrollo de melanomas (Burns y col., 1993; Sikorsky y col., 1980), así como el número de linfocitos T cooperadores y su capacidad de proliferación ante estímulos inespecíficos como Fitohemaglutinina (PHA) o Concanavalina A (ConA) (Burns y col., 1993). Así mismo, este tratamiento disminuye el número de células productoras de anticuerpos en contra de antígenos T-dependientes (Sikorsky y col., 1991). Sin embargo, también se ha reportado que dosis menores de As (50 mg/kg) pueden inducir el aumento en la proliferación de linfocitos ante estímulos inespecíficos. La interpretación de estos datos sugiere que los linfocitos T citotóxicos/ supresores (LTs/c) tienen mayor susceptibilidad al As que los Linfocitos T cooperadores (LTh), por lo que a bajas dosis la función supresora se ve afectada dando por resultado el predominio de la actividad estimuladora de células LTh. En la literatura también se ha reportado que tras la intoxicación agudo (una sola dosis) de ratones con As (Sikorsky y col., 1989; Kerkevliet y col., 1990), existe un aumento en la resistencia del hospedero a infecciones estreptocóccicas y con *Lysteria* (Burns y col., 1993), así como un incremento en la cantidad del componente C3 del complemento, además de aumento de la actividad de

células NK contra células neoplásicas. Por otro lado, se ha observado que tras una intoxicación crónica, existe un aumento en la resistencia del huésped a algunas células neoplásicas como las MSV de sarcoma (Kerkeviet y col., 1990). En lo que respecta a la intoxicación crónica en roedores, la única referencia existente a la fecha registra un aumento en la resistencia de ratones al desarrollo de tumores tras la inoculación de células de sarcoma MSB. Como es de esperarse, no existen datos acerca del efecto del As sobre diferentes mecanismos inmunitarios tras la exposición aguda en el humano. Los reportes que se tienen sobre los efectos del As sobre el sistema inmune en el humano, han sido realizados con células obtenidas de personas crónicamente expuestas a As, principalmente a través de la ingestión de agua conteniendo altas cantidades de As (Gonsebatt y col., 1992,1994; Yu y col., 1992,1998). Los efectos descritos en estos casos también se refieren tanto a la estimulación como a la supresión de diferentes parámetros (Yu y col., 1992, 1998) similares a los descritos en animales. Dado que estos reportes no permiten obtener conclusiones concretas sobre efectos inmunotóxicos del As y sus posibles consecuencias sobre las enfermedades infecciosas, la evaluación de la exposición a As sobre diferentes parámetros inmunes de una forma integral a través del uso de un modelo experimental de intoxicación, resulta de suma importancia.

1.5 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS TOXICOS AMBIENTALES SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Como ya fue descrito, los efectos producidos por la interacción de sustancias tóxicas encontradas en el medio ambiente sobre las diferentes células que constituyen el tejido linfoide, incluyen una diversidad de efectos que incluyen el desarrollo de reacciones alérgicas, autoinmunidad, proliferación celular incontrolada, incapacidad para eliminar células neoplásicas, respuestas de inmunosupresión ó alteraciones en los diferentes mecanismos de defensa del hospedero en contra diversos patógenos.

Dado que la medición de un solo parámetro inmunológico no puede ser utilizada para una evaluación adecuada de los efectos deletéreos sobre el sistema inmune después de la exposición a un determinado tóxico, se han propuesto ensayos *in vivo* e *in vitro* para evaluar efectos de inmunotoxicidad utilizando animales de experimentación como modelos de intoxicación. Tales ensayos, siguen dos esquemas que han sido llamados TIER I , para la detección de alteraciones básicas en el sistema inmune, y TIER II, para una caracterización más precisa de las alteraciones inmunológicas (Tabla 1). Estos esquemas son recomendados por la Food and Drug Administration (FDA) y la Environment Protection Agency de los Estados Unidos (EPA) para la identificación de efectos inmunotóxicos de múltiples compuestos que van desde alimentos hasta tóxicos ambientales. Los ensayos de inmunocompetencia propuestos incluyen la evaluación de inmunopatología, función de la inmunidad celular mediada por células (CMI), inmunidad humoral, función de macrófagos y resistencia del huésped a infecciones (Dean y col., 1979).

TABLA 1. PANEL TIER I Y TIER II PARA LA DETECCIÓN DE ALTERACIONES INMUNES TRAS LA EXPOSICIÓN A SUSTANCIAS QUÍMICAS Y FÁRMACOS EN ROEDORES.

PARAMETROS	PROCEDIMIENTOS TIER I	PROCEDIMIENTOS TIER II
<i>Inmunopatología</i>	<u>Histología:</u> bazo, timo, médula ósea, nódulos linfáticos. <u>Pesos:</u> corporal, bazo, timo, riñón, etc. <u>Hematología:</u> cuenta completa y diferencial de leucocitos.	Perfil de marcadores de superficie celular (% de células T y B, macrófagos y subpoblaciones de células T).
<i>Resistencia del hospedero</i>	n.a.	Reto con <i>Listeria monocytogenes</i> . Y <i>Streptococcus</i> Susceptibilidad al trasplante de tumores singénicos.
<i>Inmunidad Celular</i>	Blastogénesis de linfocitos en respuesta a mitógenos y leucocitos alogénicos.	Cuantificación de linfocinas. Función de Linfocitos T citotóxicos. Citotoxicidad celular dependiente de Ac's.
<i>Inmunidad Humoral</i>	Células formadoras de placas. Niveles de IgM específica.	Cuantificación de células progenitoras de células B. Respuestas primarias de Ac's a antígenos T-independientes. Respuestas secundarias de Ac's a antígenos T-dependientes.
<i>Función de Macrófagos</i>	n.a	Cuantificación de macrófagos peritoneales y capacidad de fagocitosis. Niveles macrofágicos de ectoenzimas. Histólisis de células tumorales. Actividad bactericida.
<i>Función de Granulocitos</i>	n.a	Reducción de NTB, estallido respiratorio.
<i>Médula ósea</i>	n.a	Cuantificación de células estaminales pluripotenciales. Cuantificación de células progenitoras de granulocitos/macrófagos.

n.a. = no aplica.

1.5.1 Histopatología.

Las alteraciones en el peso o tamaño de órganos linfoides así como de su histología o de cambios cuantitativos en leucocitos y en las subpoblaciones celulares, son parámetros utilizados en el tamizaje inicial del potencial inmunomodulador de un tóxico ambiental en roedores. Por ejemplo, el peso del bazo, expresado en términos de la relación peso del bazo/peso corporal, puede ser indicador de una disfunción inmune. En este órgano se observa la disminución de centros germinales (hipoplasia linfoide) después de la exposición a tóxicos inmunosupresores y generalmente se acompaña por una disminución en la habilidad del roedor para producir anticuerpos de la clase IgG (Shurmann y col., 1994).

1.5.2 Inmunidad celular.

Los ensayos actualmente disponibles para evaluar la inmunidad mediada por células, incluyen la determinación de las respuestas linfoproliferativas a mitógenos y a leucocitos alogénicos en cultivo. Bajo ciertas condiciones pueden presentarse alteraciones en las respuestas proliferativas de animales tratados con agentes inmunosupresores, aún cuando cantidades normales de linfocitos están presentes, indicando una falla celular de tipo funcional (Adams y col., 1982; Dean y col., 1982b; Bekesi y col., 1996).

1.5.3 Inmunidad Humoral.

La cuantificación de inmunoglobulinas para evaluar la inmunidad humoral resulta especialmente útil para la evaluación inmunológica en ratones intoxicados crónicamente (Dean y col., 1982^b). La respuesta inmune humoral frente a un antígeno, puede ser cuantificada ya sea por la medición de anticuerpos séricos o bien por la determinación del número de células productoras de anticuerpos en respuesta al reto con un antígeno específico (Dean y col., 1979, 1982 b; Bekesi y col., 1986).

1.5.4 Macrófagos.

Dado que la función de los macrófagos está regulada por linfocitos, los ensayos para la evaluación de la función macrofágica evalúan no solamente su función fagocítica inespecífica y su actividad regulatoria en las respuestas inmunes, sino también la eficacia de sus funciones de regulación a través de citocinas. La exposición a tóxicos ambientales, puede alterar la capacidad basal de los macrófagos para responder a estímulos de activación. Los ensayos para la evaluación de este parámetro inmune, incluyen la cuantificación de la capacidad fagocítica y la capacidad de inhibición del crecimiento de células tumorales. (Adam y col., 1982).

1.5.5 Granulocitos.

La actividad granulocítica puede ser determinada por la medición de actividades fisiológicas como fagocitosis, actividad quimiotáctica, actividad bactericida o la

capacidad de realizar estallido respiratorio. Esta última medida a través de la reducción de nitro azul de tetrazolio (NBT), o del compuesto 2´7 diclorofluoresceína.

1.5.6 Capacidad para eliminar infecciones.

El reto de un animal con un agente infeccioso resulta ser un método simple para determinar el efecto inmunomodulador de un determinado tóxico (Dean y col., 1982a). Este procedimiento provee de información general sobre la capacidad del agente tóxico para interferir con la resistencia del huésped en contra de patógenos.

1.6 RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS HACIA TÓXICOS Y FÁRMACOS.

La asociación entre niveles altos de contaminantes ambientales y zonas habitadas por poblaciones humanas con altas prevalencias de enfermedades infecciosas es muy frecuente (Díaz-Barriga y col., 1994; Zanobetti y col., 2000). Buena parte de la relevancia de los tóxicos contaminantes ambientales parece residir en su potencial para afectar tanto al huésped como a los agentes etiológicos causantes de las infecciones. Por un lado, los contaminantes ambientales pueden deteriorar las barreras naturales contra agentes infecciosos como son la piel y los epitelios mucosos que recubren los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. Además, como ya fue mencionado, pueden causar alteraciones de los mecanismos inmunes de resistencia y tienen efectos mutagénicos particularmente en células con alta actividad proliferativa como son los diversos tipos celulares involucrados en las respuestas inmunes (Gillin y

col., 1990; Gonsebatt y col., 1994). Por otro lado, ya que se ha descrito que en varios organismos patógenos infecciosos existen mecanismos que confieren resistencia hacia diversos metales tóxicos, los contaminantes ambientales podrían ejercer una presión selectiva de variantes que posean dichos mecanismos. Tales mecanismos de resistencia descritos en diversas especies bacterianas patógenas y algunas especies de parásitos, consisten de bombas transportadoras que mantienen concentraciones intracelulares bajas del tóxico al eliminarlo del medio intracelular (Borst y col., 1995; Cervantes y col., 1994; Silver y col., 1996). En otros casos, se ha descrito que existen mecanismos de detoxificación metabólica capaces de inactivar a los tóxicos mediante cambios en su estado químico y eliminación de los metabolitos resultantes (Kägi y col., 1987). Por otro lado, la actividad mutagénica de muchos compuestos tóxicos podría contribuir a un incremento en la variabilidad biológica normalmente mostrada por los agentes etiológicos infecciosos. Los efectos tanto en el huésped como en el agente infeccioso resultan mas relevantes en aquellas enfermedades infecciosas en las que se observa un balance precario entre los mecanismos de protección del huésped y la virulencia o patogenicidad del agente etiológico.

Un mecanismo adicional de protección en contra de los efectos tóxicos de metales descrito tanto en células procariontes como eucariontes son las metalotioneínas, que constituyen una familia de proteínas con un alto contenido característico de residuos de Cisteína (Cys). Estas proteínas son capaces de unir diversos iones metálicos mediante enlaces coordinados, a través de grupos sulfhidrido libres (Kägi y col., 1987, Turner y col., 1995). En la superficie de los trofozoítos del protozoario *G. lamblia* existe una proteína cuyas características parecen corresponder perfectamente a las metalotioneínas de clase I que han sido descritas: alto contenido de Cys, bajo

contenido de His y Arg, secuencias características Cys-X-Cys y capacidad de unión a metales (Turnery col., 1995). Esta proteína se encuentra en grandes concentraciones en la membrana plasmática de los trofozoítos de *Giardia lamblia* constituyendo las llamadas "Variable Surface Antigen Protein" o VSAP (Nash y col., 1993). Como su nombre lo indica, las VSAP presentan alta antigenicidad en humanos. Estas proteínas también presentan alta variabilidad antigénica debida, por un lado, a la expresión de variantes genéticas de la misma proteína codificadas por un número no bien determinado de genes, arreglados en tandem a lo largo de uno de los cromosomas del microorganismo (Gillin y col., 1990); por otro lado, estos genes parecen ser alterados por la alta proporción de mutaciones reportado para el genoma de *G. lamblia* (Ey y col., 1993). Se ha sugerido que estos mecanismos, la expresión secuencial y la alta proporción de mutaciones, pueden contribuir como mecanismos de evasión de la inmunidad desarrollada por el hospedero, de una manera similar a lo observado en las tripanosomiasis africana (McCulloch y col., 1991). La alta proporción de mutaciones normalmente observada en *G. lamblia*, aunado a los efectos mutagénicos de compuestos tóxicos ambientales, podrían amplificar la variabilidad antigénica del microorganismo haciendo aún mas difícil el desarrollo de respuestas inmunes eficaces en contra del parásito. De igual manera, los efectos mutagénicos de compuestos tóxicos ambientales podrían también contribuir al desarrollo de los cada día mas frecuentes microorganismos con resistencia a fármacos, como es el caso de *G. lamblia* (Majewska y col., 1991), de la cual se han obtenido aislados que presentan resistencia a nitroimidazoles y nitrofuranos (Towson y col., 1994). Entre los mecanismos de resistencia a metronidazol descrito para *Giardia* y *Trichomonas* se encuentran la pérdida de activación del fármaco por una disminución en la cantidad de ferredoxina,

que participa en la activación del antibiótico (Towson y col., 1995). A nivel molecular, esta resistencia se ha asociado a mutaciones en *G. lamblia* (Upcroft y col., 1992).

1.7 LA GIARDIOSIS COMO UN MODELO PARA EVALUAR INMUNOTOXICIDAD.

La giardiosis podría constituir un excelente modelo para dilucidar los efectos del medio ambiente sobre enfermedades infecciosas. En la giardiosis murina se ha descrito que alteraciones en tan sólo uno de los múltiples factores de inmunidad tiene consecuencias importantes sobre el curso o gravedad de la infección. Se ha determinado que defectos en la producción de anticuerpos, en la funcionalidad de células linfocíticas Th (cooperadoras) ó en macrófagos y otras células granulocíticas, pueden transformar la giardiosis murina de una infección transitoria, con una duración de 10 semanas, en infecciones de tipo crónico que puede durar toda la vida del ratón. De igual manera, en humanos se han reportado que inmunodeficiencias tales como hipogammaglobulinemias congénitas y adquiridas, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, y otras, confieren un alto riesgo de infecciones giardiósicas persistentes o de gravedad. La importancia del modelo murino reside principalmente en la existencia de cepas singénicas de ratones que, como una característica genética, desarrollan infecciones ya sea de tipo transitorio o crónico. La mayoría de las cepas murinas que sufren giardiosis primaria crónica, muestran deficiencias de diversos elementos del sistema inmune. Además, el modelo murino ha hecho posible la identificación y manipulación de los factores inmunes involucrados en la respuesta contra de parásito (den Hollander y col., 1988; Heyworth 1992).

1.8 EL GENERO *Giardia*.

El género *Giardia* pertenece al orden Diplomonadida y a la familia Hexamitidae. Actualmente se reconocen tres especies por medio de criterios puramente morfológicos: *G. lamblia* (también conocida como *G. duodenalis* o *G. instestinalis*), que infecta a los seres humanos y otros mamíferos; *G. muris*, hallada en los roedores y *G. agilis* hallada en las ranas (Hill y col., 1991). De las tres especies morfológicas, solamente se ha cultivado exitosamente *G. lamblia*, cuyo crecimiento se ve incrementado en presencia de sales biliares, lo que podría explicar su predilección por la colonización del intestino delgado. Es un anaerobio aerotolerante, metaboliza la glucosa a etanol, acetato y CO₂, carece de mitocondrias, utiliza los fosfolípidos, ácidos grasos, el colesterol y las pirimidinas del medio ambiente (Hill y col., 1991). *Giardia lamblia*, protozooario entérico flagelado, ha surgido en los últimos años como causa importante de diarrea endémica y epidémica. Debido a su distribución mundial, es un importante agente etiológico de las diarreas crónicas debilitantes y de la diarrea de los viajeros. En Estados Unidos es el parásito entérico de mayor prevalencia y el principal agente infeccioso identificado en epidemias de diarreas transmitidas por el agua (Leder y col., 1999). En los países en vías de desarrollo, *G. lamblia* constituye uno de los principales patógenos entéricos en lactantes (Gilman y col., 1985; Leder y col., 1999). En México la prevalencia de giardiosis reportada en distintos estudios va del 2% al 80%, dependiendo de la edad, condiciones sanitarias, socioeconómicas o culturales de la población analizada (Salazar y col., 1981; Guerrero y col., 1983). Por otro lado, se ha observado mayor prevalencia y gravedad de giardiosis en infantes y en sujetos con

deficiencias o supresiones del sistema inmune, que en el resto de la población (Farthing 1985; Ward y col. 1985; Gilman y col., 1985; Lev y col., 1986). La adquisición del parásito requiere la ingestión por vía oral de los quistes de *G. lamblia*, lo que ocurre generalmente a través del agua contaminada con materia fecal. Sin embargo la transmisión interpersonal es la segunda forma más importante de infección que se presenta principalmente en individuos con malos hábitos de higiene, en niños pequeños en guarderías, homosexuales masculinos sexualmente activos y en internos de instituciones de custodia (Leder y col., 1999). Aunque poco reconocido, la transmisión a través de alimentos contaminados con materia fecal parece ser un mecanismo adicional de transmisión (Peterson y col., 1988; Mintz y col.,1993).

Tras su ingestión y paso por el estómago, los quistes liberan a los trofozoítos quienes colonizan y proliferan en el intestino delgado, principalmente en el duodeno y la porción superior del yeyuno. Bajo condiciones intestinales que no se conocen completamente, algunos trofozoítos se transforman en quistes que son excretados en las heces para reiniciar el ciclo de vida.

1.8.1 Manifestaciones clínicas de la giardiosis.

Las manifestaciones clínicas de la infección con *G. lamblia*, incluyen diarrea acuosa autolimitada aguda, o bien diarrea crónica intermitente con heces fétidas, dolor abdominal y flatulencia. En los casos graves también se puede observar malabsorción y pérdida de peso (Hill y col., 1991, Leder y col., 1999). Se estima que el 5-15% de la infecciones con *G. lamblia* son asintomáticas, 25-50% presentan cuadros diarreicos agudos y el 35-70% no presenta síntomas.

1.8.2 Patogenia y respuesta inmune en giardiosis.

Han sido postulados varios mecanismos patogénicos en la giardiosis. Mediante microscopía electrónica se ha observado daño en el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal (Farthing 1997). Así mismo, tanto en infecciones humanas con *G. lamblia* como en infecciones murinas con *G. muris* (WelsH y col., 1984; Guillon y col., 1982), se han reportadas deficiencias en disacaridasas Intestinales, especialmente de lactasa. Además se ha reportado que en ratones infectados con *G. muris* existe una mayor velocidad de renovación de las células epiteliales de las criptas intestinales (Guillon y col., 1982), lo que podría ocasionar cambios en la capacidad absortiva del intestino.

Un componente muy importante en la relación hospedero-parásito de la giardiosis, es la respuesta inmune del huésped en contra del parásito (den Hollander y col., 1988). Los diferentes mecanismos inmunes celulares y humorales juegan un papel importante de protección en contra de los trofozoítos de *G. lamblia* y en su eliminación. Sin embargo, en ocasiones la intervención de estos mismos mecanismos se ha asociado directamente con la producción de enfermedad (den Hollander y col., 1988).

La participación de la respuesta inmune en la protección en contra de giardiosis es evidente en la mayor prevalencia observada en sujetos que sufren deficiencias o supresiones del sistema inmune. Por ejemplo, la alta prevalencia de giardiosis observada en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida sugiere la participación activa de linfocitos T (LT) en la protección en contra de giardiosis (Tandon y col., 1977). En el modelo animal, se ha encontrado que los ratones atímicos

(nude/nude), con deficiencia genética en el desarrollo de LT, sufren infecciones crónicas por *G. muris* que contrastan con las infecciones transitorias (< de 10 semanas) desarrolladas por ratones eutímicos (Balazs y col., 1978). Así mismo, ratones eutímicos depletados de LT cooperadores (LTh) con anticuerpos en contra del marcador L3T4, son susceptibles a desarrollar giardiosis crónica (Polis y col., 1986). Además, la reconstitución de ratones atímicos con células linfoides procedentes de ratones eutímicos restablece la capacidad de eliminar la infección (Roberts-Thomson y col., 1978).

Durante una infección gastrointestinal con *Giardia* se produce una respuesta inmune humoral sistémica, sin embargo dado que la infección con este parásito se limita a la luz del intestino delgado, específicamente en el duodeno, los anticuerpos secretados intestinales, juegan un papel más importante en la eliminación del parásito. Durante las infecciones con *Giardia*, se ha demostrado el aumento de células que expresan anticuerpos tanto del tipo IgM, IgG e IgA. En el modelo murino, la IgA ha sido la clase de inmunoglobulina predominante detectada en las secreciones intestinales y su desarrollo se correlaciona cronológicamente con la eliminación del parásito (Heyworth 1986, Snider y col., 1986). Ha sido demostrado que la ausencia de IgA secretoria se asocia con una incapacidad para resolver la infección (Snider y col., 1985).

La participación de anticuerpos producidos por activación de linfocitos B (LB) en contra de giardiosis, ha sido ampliamente documentada tanto en humanos como en el modelo murino. Pacientes con hipogamaglobulinemia ligada al cromosoma X, deficiencia selectiva de inmunoglobulina A (IgA), etc., presentan mayor prevalencia de giardiosis (Gillin y col., 1996; Barbour y col., 1976; Nash y col., 1985b). En la giardiosis humana se producen tanto en suero como en secreciones anticuerpos específicos de los isotipos

G, A y M dirigidos contra antígenos de *G. lamblia* (Nash y col., 1985; Ward y col., 1985). La alimentación con leche o calostro conteniendo IgA contra *G. lamblia*, protege parcialmente a los infantes limitando la gravedad de la infección (Pettersen y col., 1972; Knight 1989). Estos anticuerpos podrían deber su efecto a la destrucción del parásito mediante inactivación de moléculas de superficie críticas para su sobrevivencia, o por la activación del complemento. Observaciones similares han sido realizadas en el modelo murino en donde ratones con inmunodeficiencia ligada al cromosoma X (X^d); equivalente a la hipogamaglobulinemia observada en humanos), o ratones depletados de LB y células plasmáticas, desarrollan giardiosis crónica (Den Hollander y col., 1988; Oyerinde y col., 1977).

La participación de macrófagos, células cebadas y neutrófilos ha sido estudiada con mayor detalle en el modelo murino. Los ratones con genotipo *Wv/Wv*, que presentan una deficiencia en la maduración células cebadas, son incapaces de eliminar la giardiosis primaria (Gilman y col., 1988). Además, se ha observado que los macrófagos fagocitan activamente trofozoítos asociados al epitelio intestinal e, *in vitro*, los neutrófilos son capaces de destruir trofozoítos del parásito (Nash y col., 1985a; Farthing 1986).

Es importante notar que la susceptibilidad de los ratones para desarrollar giardiosis crónica se limita a exposiciones primarias, ya que la mayoría de las cepas de ratones que desarrollan giardiosis primaria crónica, adquieren resistencia a infecciones secundarias, transformándose estas en infecciones transitorias (Owen y col., 1979; Saha y col., 1977). Esto sugiere que los mecanismos inmunes de protección contra giardiosis secundaria pueden ser diferentes de los involucrados en la protección contra giardiosis primaria.

1.9 JUSTIFICACION.

En nuestro país, así como en otros países en vías de desarrollo, resulta frecuente observar que en las zonas de más bajo nivel socioeconómico, prevalecen altos índices de contaminación ambiental. En estas regiones es común observar la coexistencia de un alto grado de enfermedades infecciosas gastrointestinales, tales como giardiosis. Estos tóxicos ambientales pueden causar un doble efecto, alterando por un lado los mecanismos de defensa del huésped y por otro modificar diferentes características biológicas de los agentes infecciosos, tales como sus patrones de crecimiento, resistencia a tóxicos ó antibióticos. Estos efectos podrían traducirse en alteraciones del curso y gravedad de las infecciones. Una de las principales vías de exposición a diferentes tóxicos ambientales en los habitantes de las zonas de marginación social lo constituye la vía oral. Además ya que los períodos de exposición son en general muy prolongados, éstas constituyen exposiciones crónicas. Los estudios en animales de laboratorio que han abordado la vía de exposición oral para valorar su efecto inmunomodulador, son muy escasos. Adicionalmente, en estos estudios los animales experimentales generalmente han sido expuestos a dosis únicas o agudas. Por lo tanto, existe poca información sobre los efectos de exposiciones a tóxicos ambientales por vía oral y de forma crónica. Dada la importancia de la modalidad de exposición oral crónica en la población humana de la región central de nuestro país, estimamos necesario realizar un análisis integral de los efectos de intoxicación con As sobre diferentes mecanismos de defensa inmunitaria de ratones sujetos de experimentación y que incluyera el reto con una contraparte murina (*Giardia muris*) del agente infeccioso parásito gastrointestinal *G. lamblia*, común en nuestra población.

1.10 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos que tiene la intoxicación oral crónica por As sobre los principales mecanismos de protección inmune en ratones y en las características de la giardiosis murina .

1.11 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar los efectos de la intoxicación por As sobre los principales mecanismos de inmunidad en contra de la giardiosis murina.
2. Evaluar los efectos que la intoxicación por As tiene en el curso de giardiosis murina usando el modelo de ratón y *G. muris*.
3. Evaluar el efecto de la exposición a As en el crecimiento *In vitro* de los trofozoítos de *Giardia lamblia*.

CAPITULO

2

MATERIALES Y METODOS

2.1 ANIMALES UTILIZADOS Y TRATAMIENTOS.

En este estudio se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c o CBA/CaHN(X^{6d}) (The Jackson Lab. Bar Harbor, Maine, E.U.A), de 6 a 8 semanas de edad. En todos los casos, los ratones se mantuvieron libres de parásitos y con alimentación normal (LabDiet, Prolab Laboratory Animal Diet).

Para la determinación del efecto de la intoxicación crónica oral con NaAsO₂ sobre diferentes parámetros inmunológicos, se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad. Se establecieron cuatro grupos experimentales los cuales fueron mantenidos libres de parásitos, con alimentación normal y con agua de consumo libre de tóxicos (grupo control) o conteniendo, 50, 125 y 250 µg/mL de NaAsO₂ (grupos problema). Los ratones se intoxicaron por un período de 6 semanas (45 días), considerado en este estudio como intoxicación crónica.

Para determinar el efecto de la intoxicación con As sobre el peso corporal y su relación con el peso del bazo, los ratones se pesaron en una balanza granataria tanto al inicio como al término del período de intoxicación, día en que fueron sacrificados. El bazo de los ratones se extrajo, se liberó del exceso de tejido, se lavó en amortiguador salino de fosfatos (PBS) y se pesó en una balanza analítica . El peso del bazo de cada uno de los ratones se expresó como el porcentaje del peso total corporal.

2.2 OBTENCION DE TEJIDOS, ORGANOS Y CELULAS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

2.2.1 Obtención del bazo y CMN.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el bazo asépticamente y se colocó en una solución amortiguadora de fosfatos-EDTA (PBS-EDTA: 10 mM fosfatos, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, pH 7.0) .

Para la obtención de las CMN, el bazo se homogenizó con un émbolo de jeringa estéril, la suspensión celular obtenida se colocó en un tubo cónico de 15mL y se centrifugó a 250 xg por 10 min. El botón celular se trató con una solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 200 mM, KHCO₃ 10mM, EDTA 0.1mM) por espacio de 1 min. Inmediatamente después, las células se lavaron en dos ocasiones con PBS-EDTA y se cuantificaron en hematocitómetro con azul de tripano (90%) como colorante vital.

2.2.2 Obtención de Intestino

Se obtuvo una sección de 2 cm de longitud del intestino delgado, correspondiente a la fracción duodenal. Cada sección se colocó en tubos de ensayo graduados para determinar el volumen promedio ocupado por el tejido. A continuación, se determinó el peso de cada una de las secciones de intestino en una balanza analítica. Finalmente, los tejidos se congelaron a -20°C hasta su uso.

2.2.3 Obtención de sangre, suero y células PMN.

Aproximadamente 1 mL de sangre completa de cada uno de los ratones incluidos en los diferentes grupos experimentales se obtuvo del seno ocular. Para la obtención de las células PMN, la sangre se trató con 15 mL de solución lisadora de eritrocitos, manteniendo los tubos en hielo. Al cabo de 10 minutos se centrifugó a 250 xg a 4°C por 10 minutos, se lavó el botón celular en dos ocasiones por resuspensión en solución balanceada de Hank (HBSS; 1.0mM CaCl, 5.0mM KCl, 0.45mM KH_2PO_4 , 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.15mM NaCl, 4mM NaHCO_3 , 3.3mM Na_2HPO_4 , 5.5mM glucosa, pH 7.0) y centrifugación a 200 xg a 4°C por 10 minutos. Para la obtención del suero, la sangre se recogió en tubos Eppendorff estériles sin el uso de anticoagulantes. La sangre se almacenó a 4°C por 2 hrs y entonces se centrifugó a 1500 xg por tres minutos. El suero sobrenadante se recuperó con pipeta Pasteur, se colocó en tubos Eppendorf y se almacenó a 4°C hasta su uso.

2.2.4 Células peritoneales.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. El abdomen se lavadó con alcohol al 70% y se inyectó 5 mL de HBSS estéril en la cavidad peritoneal. Se realizó un suave masaje en el abdomen por espacio de 5 minutos y el líquido peritoneal se recuperó con una pipeta Pasteur estéril y se colocó en un tubo cónico estéril. Las células obtenidas se lavaron en dos ocasiones con PBS-EDTA por resuspensión y centrifugación a 250 xg por 10 min. Las células se cuantificaron en un hematocitómetro usando azul de tripano como colorante vital.

2.3 DETERMINACIÓN DE As EN ORGANOS.

Con el fin de evaluar las concentraciones de NaAsO_2 que fueron alcanzadas en los tejidos de los ratones de cada uno de los diferentes grupos experimentales, se midió la concentración de As total presente en el bazo y el intestino al término del período de exposición al tóxico. El As se cuantificó en el bazo de los ratones, dado que en este importante órgano linfoide en el que se analizaron diversos parámetros funcionales y estructurales inmunológicos. Así mismo, se analizó un segmento de 2 centímetros de intestino delgado correspondiente a la porción duodenal, sitio donde se establece primordialmente la infección por *G. muris*. Ambos tejidos se pesaron en una balanza analítica tras su extracción e inmediatamente se congelaron a -20°C hasta su uso. La determinación de As en los tejidos se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica a través de la formación de hidruros (Hwillard y col., 1982). Cada muestra, tejido, bazo o intestino, fue digerida con 5 mL de HNO_3 al 65% y 0.5 mL de Ac perclórico al 70% hasta la evaporación casi completa de la mezcla de ácidos. El residuo

de la digestión de las muestras se solubilizó con 5mL HCl al 3%. La cantidad de As presente en las muestras digeridas se midió en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer 2380). Todas las mediciones se realizaron utilizando un corrector de deuterio. Como estándar de referencia de concentración de As se utilizó hígado liofilizado (NIST 1577b Bovine Liver) y se obtuvo un 98% de recuperación.

Los datos obtenidos de la cuantificación de As en el intestino y en el bazo se expresaron en ng/g de tejido.

Con fines comparativos la concentración de As en el Intestino expresada como µg de As por volumen (litro) de tejido se calculó con la siguiente fórmula:

Ecuación 1.

$$[\text{As}] (\mu\text{g/L}) = \frac{[\text{As}] (\text{ng/g}) \times \text{peso intestino (g)} \times 1000}{\text{Volumen de intestino (mL)}}$$

2.4 ANALISIS HISTOPATOLOGICO.

Al término del período de exposición a As, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y tanto el timo como el bazo se disecaron y se fijaron en solución de Bouin (75% solución saturada de ácido pícrico, 25% formaldehído, 5% ácido acético glacial) durante 24 hrs. Posteriormente las muestras se sumergieron en una mezcla de etanol absoluto y solución de Bouin en cantidades iguales, durante 2 hrs. Los tejidos se deshidrataron mediante inmersión en alcohol etílico de concentraciones crecientes de 70 a 99.9 %, por espacio de 30 min en cada uno. A continuación se realizó el aclaramiento de los tejidos con xilol durante 20 min en dos ocasiones, seguido de la inclusión en parafina. Los tejidos se cortaron en secciones de 5 a 6 μ m en un microtomo (Leica, Reichert-Jung Histocut). Las secciones obtenidas se colocaron en un baño de flotación de tejidos (Lab-Line, Lo-boy tissue float bath), se recogieron sobre portaobjetos, se desparafinaron y se rehidrataron por inmersión en concentraciones decrecientes de alcohol etílico 99.9 a 70%. Finalmente las secciones de tejido se tiñieron con hematoxilina (Analytyka H0035S) y Eosina. (Sigma 45380) por un procedimiento convencional (Clark y col., 1973).

2.5 PROLIFERACION DE CMN DE BAZO.

La concentración de células se ajustó a 2.6×10^5 cel/mL con RPMI (Sigma R6504) completo (0.5mM Mercaptoetanol, 100 u/mL Penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, 10% Suero Bovino Fetal). Se colocaron 2×10^5 células en cada pozo de una microplaca de cultivo de fondo plano en un volumen de 150 µL de medio. Se evaluaron diferentes concentraciones de mitógenos para estimular la proliferación celular, así como diferentes tiempos de incubación posterior a la adición de estos últimos. Las concentraciones utilizados de los mitógenos probados para lograr la estimulación de la proliferación de los linfocitos fueron : para Concanavalina A (Con A; Sigma C-5375) 0.25,0.5, 1.0 2.0 y 4.0 µg/mL y para mitógeno de Pokeweed (PWM; Sigma L-8777) 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 µg/mL, ambos disueltos en medio RPMI. Los tiempos de incubación probados para cada condición fueron 1,3, 5 y 7 días. Se incluyeron controles negativos de proliferación de linfocitos sin estimular, a los que se añadió sólo medio RPMI sin mitógenos. Los mitógenos se añadieron en un volumen de 10 µL por pozo. La proliferación celular fue evaluada midiendo la capacidad de los linfocitos para transformar el reactivo de Owen (3-(4-5 dimetil-tiazol-2-il-5 (3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfoenil)-2 H tetrazolina; MTS) en un compuesto colorido. Para ello, se añadieron a cada pozo 20 µL de una mezcla de MTS 1.90 µg/mL (Promega G1111) y Metasulfato de Fenazina 0.046 µg/mL (Phenazine methasulfate PMS, Sigma P9625). La microplaca se incubó por un espacio de 2 hrs a 37°C. y la reacción colorimétrica se midió en un lector de ELISA (Multiskan ELISA Reader, Labsystems) con un filtro de 540nm.

Las concentraciones óptimas necesarias para estimulación de la proliferación linfocitaria fueron de 1.0 µg/mL para ConA y de 5.0 µg/mL para PWM , ambos a las 48 hrs de incubación a 37°C, en una atmósfera conteniendo 5% de CO₂ y 10% de humedad.

2.6 PRODUCCION DE OXIDO NITRICO (NO) POR MONOCITOS Y MACROFAGOS PERITONEALES.

La suspensión celular se ajustó a 6.8×10^5 cel/mL con RPMI completo. Se colocaron 500,000 células por pozo en un volumen de 150 µL en una microplaca de fondo plano. El porcentaje de células adherentes en estas preparaciones siempre fue menor al 3%, por lo que no se realizaron procedimientos adicionales para su eliminación. Las concentraciones óptimas para la inducción de la producción de nitritos por las células peritoneales con éster de Forbol miristato (PMA, Sigma P 8139), Lipopolisacárido (LPS, Sigma L8399) y combinaciones de ambos, se determinaron usando 20,10,5 y 2.5 nM para PMA, 1.2, 2.5, 5.0 y 10.0 µg/mL para LPS y para las combinaciones de 2.5 ó 5.0 µg/mL de LPS con 5.0, 10 ó 20 nM de PMA. Todos los inductores fueron añadidos a los pozos de la microplaca en un volumen de 10µL, ajustando del volumen total final a 200 µl con RPMI completo. Para determinar el tiempo óptimo de inducción para la producción de NO, las placas se incubaron durante 24, 48 ó 72 horas, transcurridos los cuales, alícuotas de 100 µL del sobrenadante de cada uno de los pozos se mezclaron con 100 µL de reactivo de Griess (Sulfanilamida, Sigma S925, 0.5µg/mL en ácido fosfórico al 5%,; dihidroclorhidrato de naphtilen-diamino, Sigma E2126, 0.5 µg/mL en agua destilada y desionizada,). El desarrollo de color se determinó a los 30 minutos de incubación con el reactivo, en un lector de ELISA utilizando un filtro de 550 nm. La

cantidad de NO producido en los ensayos se calculó usando una solución estándar de nitrito de sodio con concentraciones de entre 1 a 100 μM . Las condiciones óptimas para la inducción de la producción de nitritos en monocitos y macrófagos peritoneales después de la estimulación con mitógenos fueron de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para LPS, de 5.0 nM para PMA y 2.5 μM de LPS con 10nM de PMA para la combinación, con incubación de 48 hrs a 37°C, 10% de humedad y 5% de CO_2 .

2.7 ESTALLIDO RESPIRATORIO POR PMN DE SANGRE PERIFERICA.

La suspensión de células PMN se ajustó a 1×10^6 cel/mL. 2.5 mL. Se colocaron 2.5 mL de esta suspensión en tubos cónicos y se añadieron 2.5 μL de 2'-7'-dichlorofluoresceína (Sigma D6665) 20 mM en etanol absoluto (20 μM concentración final) incubándose la mezcla en baño maría a 37°C por espacio de 15 minutos. Para determinar la concentración óptima de estimulación, alícuotas de 250 μL se colocaron en tubos de polietileno de 12 x 75 mm de diámetro y las células se estimularon por adición de 2.5, 1.25 ó 0.6 μL de PMA (Sigma 8139) a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio RPMI libre de suero (100, 50 ó 25 ng/mL concentración final, respectivamente). El tiempo óptimo de estimulación de la inducción estallido respiratorio en los PMN se determinó por incubación 37°C por 2.5, 10, 15 ó 30 minutos. Las suspensiones celulares se colocaron en un citómetro de Flujo (Coulter Epics Profile, Florida, E.U.A). Los diferentes tipos celulares se representan visualmente en un citograma en base a su tamaño, forma y granularidad. En el citograma, donde se encuentran trazadas la intensidad de la luz dispersada hacia delante (forward scatter) contra la luz dispersada en ángulo recto (Right angle scatter), se muestran los tres principales tipos celulares (linfocitos,

monocitos y granulocitos polimorfonucleares). La población de células polimorfonucleares de cada una de las suspensiones celulares se seleccionó mediante el trazado manual de ventanas (gates o windows) para la determinación de fluorescencia, excluyéndose así linfocitos y monocitos. La intensidad de fluorescencia emitida por las células para cada una de las condiciones se determinó por medición estándar de fluorescencia (isotiocianato de fluoresceína) incluyendo en cada caso tubos controles conteniendo la suspensión celular incubada con 27' Diclorofluoresceína, sin estimular. Se determinó que la concentración de 50 ng/mL de PMA y un tiempo estimulación de 2 min resultaban óptimos para inducir el estallido respiratorio en neutrófilos.

2.8 CONCENTRACION DE IgG SÉRICA TOTAL

Los pozos de microplacas para ELISA (Immulon® II, Dynatech) se sensibilizaron con 200 µL IgG de conejo contra IgG de ratón (5 µg/mL) como anticuerpo de captura por 12 horas. Los pozos se bloquearon con 250 µL de albúmina sérica bovina al 3% en Tris-HCl (10mM Tris, pH 7.8, solución bloqueadora) por 8 horas. Cincuenta µL de los sueros obtenidos de cada uno de los ratones y diluidos 1:20,000 se añadieron a pozos por triplicado y se incubaron a temperatura ambiente por 1.5 hrs. Los pozos se lavaron en cuatro ocasiones con una solución de Tween 20 al 0.05% en TBS (0.5M NaCl, 0.02M Tris, pH 7.5, solución de lavados). Posteriormente se añadió a cada pozo 100 µL de IgG de chivo anti- IgG de ratón biotinilado (Sigma B-7022) en dilución 1:20,000 en solución dilutora (6.66% de solución bloqueadora en TBS), y se incubó nuevamente 1.5 horas a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron nuevamente con solución de lavados y entonces se añadió a cada uno 100 µL de avidina-peroxidasa (Sigma A-7419) en una

dilución de 1:20,000 en solución dilutora y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Al final de este periodo los pozos se lavaron en una ocasión. Aparte, se preparó una mezcla de reacción compuesta por dihidroclorhidrato de ortofenilendiamina 2.2 mM (Sigma P-8787) en ácido cítrico 0.1 M, a la cual se añadió 20 µL de peróxido de hidrógeno al 30% en PBS (Fosfatos 10 mM, NaCl 50 mM) e inmediatamente se añadieron 100 µL por pozo de esta mezcla. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y en la oscuridad por espacio de 15 minutos. Transcurrido este tiempo la reacción se bloqueó por adición de 50 µL de ácido sulfúrico 2.5 N. La reacción colorimétrica se midió en un lector de ELISA a 492 nm (ELISA Reader Multiskan, Labsystems).

2.9 PRODUCCION DE ANTICUERPOS IgG ESPECIFICOS EN CONTRA DE OVOALBUMINA.

Los grupos de ratones que se mantuvieron por 45 días con el régimen de intoxicación descrito, se inmunizaron en dos ocasiones al término del período de intoxicación. La primera inmunización se realizó con 100 µg/mL de ovoalbúmina (Reactivos Monterrey, No. cat 0800) en mezcla con adyuvante completo de Freund (Sigma F5881) en un volumen de 250 µL en PBS; la segunda inmunización se realizó con 100 µg/mL de ovoalbúmina mezclada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma F5506). Ambas inmunizaciones se realizaron por vía intraperitoneal y con un período de 15 días entre cada inmunización. Seis días después de la última inmunización, la concentración de IgG específica en contra de ovoalbúmina se midió en el suero de los ratones inmunizados, usando el método de ELISA descrito antes para la medición de IgG total, pero utilizando placas sensibilizadas con 10 µg/mL de ovoalbúmina en PBS.

2.10 INFECCION DE RATONES, AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE

QUISTES DE *G. muris*.

Ratones BALB/c o CBA/CaHN (X^{hd}) se inocularon por vía intragástrica con 1×10^5 quistes de *Giardia muris* suspendidos en 0.2 mL de PBS. Las heces se colectaron diariamente colocando a los ratones en cajas individuales de plástico por espacio de 2 horas. La muestra obtenida de cada uno de los ratones se pesó en su totalidad en una balanza analítica y se dividió en dos porciones iguales, las que se utilizaron para la cuantificación del número y viabilidad de quistes presentes en las heces y la humedad de la muestra, respectivamente.

En otros casos, grupos de ratones sometidos al esquema de tratamiento con el tóxico, se infectaron con quistes de *G. muris* como se describió y se permitió que la infección transcurriera normalmente hasta que los animales cesaron de excretar quistes, lo que indicaba el final de la infección. En ese momento todos los ratones se trataron con 500 mg/kg diarios de Metronidazol (Sal pura, Lab. Liomont) suspendido en el agua para beber, durante tres días consecutivos. Quince días después de este tratamiento, todos los ratones se inocularon nuevamente con 1×10^5 quistes de *Giardia muris* por vía intragástrica. El monitoreo de la excreción de quistes en estos ratones se inició al día siguiente a la inoculación del parásito y se continuó hasta la ausencia total de quistes en heces.

Los quistes excretados se aislaron a partir de 7 a 9 pellets de heces, se colocaron en 2 mL de PBS y se homogenizaron con palillos de madera. Con ayuda de una pipeta, la muestra homogenizada se estratificó cuidadosamente sobre 2.5 mL de sacarosa 1M en

tubos de ensayo de 16 x 150 mm. Los tubos se centrifugaron a 200 xg por 10 minutos a temperatura ambiente y la interfase conteniendo los quistes se colectó y se colocó en tubos de 16 x 150 mm conteniendo 2.5 mL de PBS. Los quistes recuperados se lavaron en dos ocasiones por centrifugación a 250 xg por 10 minutos y se resuspendieron con 2.5 mL de PBS. Después del segundo lavado los quistes se resuspendieron finalmente en 0.5 a 2.0 mL de PBS. Los quistes obtenidos se cuantificaron con el uso de un hematocitómetro por microscopía de campo claro utilizando un objetivo 20x.

El contenido de humedad de las heces se midió en porciones de las muestras obtenidas antes. Estas se pesaron y entonces se colocaron dentro de una estufa a 70°C por espacio de 3 hrs. Después, las muestras se pesaron nuevamente y el contenido de humedad se calculó por la diferencia de pesos antes y después de la desecación. La cantidad de quistes excretados por los ratones de cada grupo, en cada experimento, se expresó en todos los casos como número de quistes por gramo de heces secas.

2.11 DETERMINACION DE VIABILIDAD DE LOS QUISTES Y TROFOZOITOS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

La viabilidad de los quistes de *G. muris* se midió mediante microscopía de fluorescencia usando diacetato de fluoresceína como colorante vital. Se mezclaron 450 µL de PBS, 25 µL de una solución madre de Bromuro de etidio (EBr, Sigma E-7637) en concentración de 0.1mg/ mL en PBS y 2.5 µL de solución madre de Diacetato de Fluoresceína (FDA, Sigma F7378) de concentración 25 mM en acetona. Alícuotas de 50 µL de las suspensiones de los quistes obtenidos previamente se colocaron en tubos Eppendorff de 1.0 mL, se mezclaron con 10 µL de la mezcla de EBr y FDA y se observaron inmediatamente en microscopio de fluorescencia usando un filtro de excitación de 470-490 nm y filtro de barrera de 520 nm (Franco y col.,1995).

Para la medición de la viabilidad de los trofozoitos, éstos se desprendieron de las paredes de los tubos por inmersión en la mezcla de agua con hielo, se sedimentaron por centrifugación a 175 xg por 5 min. y se lavaron con PBS seguido de centrifugación a 175 xg por 10 min. Finalmente los trofozoitos se resuspendieron en 0.5 mL de PBS. Alícuotas de 50 µL de las suspensiones de los trofozoitos se colocaron en tubos Eppendorff de 1.0 mL y se mezclaron con 10 µL de la solución de FDA y EBr y se realizó inmediatamente la observación de los trofozoitos. Los quistes o trofozoitos viables se observaron fluoresciendo en verde mientras que aquellos no viables se observaron fluoresciendo en rojo.

2.12 INMUNOSUPRESION CON FOSFATO DE DEXAMETASONA.

Ratones BALB/c se mantuvieron con agua conteniendo 10 µg/mL de fosfato de dexametasona (Alin, Laboratorios DEPOT) por espacio de siete días, al término de los cuales se infectaron con 1×10^5 quistes de *G. muris* por vía intragástrica.

En otros casos, ratones BALB/c libres de tratamiento con cualquier tóxico se infectaron con 1×10^5 quistes de *G. muris* y se permitió que la infección transcurriera normalmente hasta su termino, denotado por la ausencia de detección de quistes en las heces (día 20 postinfección). Los ratones se inocularon entonces con 100 µg de dexametasona por vía i.p. La dinámica de excreción de quistes en cada uno de los ratones se monitoreó según se describió con anterioridad hasta que ésta cesó.

2.13 CEPAS DE *Giardia lamblia* UTILIZADAS.

Se utilizaron dos cepas de referencia de *G. lamblia*: Portland 1 (P1) y WB, proporcionadas amablemente por el Dr. Manuel Hernández y la Dra. Guadalupe Ortega Pierres (CINVESTAV, México, D.F.).

2.14 CULTIVO DE LOS TROFOZOITOS DE *G. lamblia*.

2.14.1 Medio TYI-S-33 completo para cultivo de *G. lamblia*.

Para el cultivo de los trofozoítos de *G. lamblia* se utilizó medio TYI-S-33 modificado. El medio base se preparó con 0.34 M de NaCl , 5.7 mM de Fosfato dibásico de Potasio (Sigma P-3786), 4.4 mM de Fosfato Monobásico de Potasio (Sigma P-5379), 2% de petona de caseína, 1% de Extracto de Levadura, 0.55 M de Glucosa (Sigma G-7528), 1 mM de ácido Ascórbico (Sigma A-0278) y 0.0022% de Citrato Férrico Amónico (Sigma F-5879), todos disueltos en agua destilada en el orden mencionado. El pH de la mezcla anterior se ajustó a 7.0 y se esterilizó en autoclave a una presión de 16 lb/pulg²/15min. Por separado se preparó una solución conteniendo 6.3 mM de L-Cisteína (Cys, Sigma C1276) y 0.8% de bilis bovina (Sigma B8381), ambos disueltos en agua destilada. El pH de esta solución se ajustó a 7.0 y se esterilizó por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de poro 0.45 µm. El complemento de Cys/Bilis se añadió en condiciones asépticas al medio base previamente preparado. Inmediatamente antes de su uso, se añadió el 10% de suero bovino descomplementado por calentamiento a 56°C, 30 minutos (Lab. Biología Celular, CINVESTAV, México, D.F.). El medio TYI-S-33 completo preparado de esta manera, se distribuyó asépticamente en tubos de medida 13 x 100 con tapón de rosca, en un volumen de 6 mL, con el uso de una jeringa de repetición estéril.

2.14.2 Cultivo y subcultivo de trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Los cultivos de *Giardia lamblia* se realizaron inoculando 2×10^5 trofozoítos de las cepas P1 y WB, suspendidos en 100 μL de medio de cultivo original, a tubos conteniendo 8 mL del medio TYI-S-33 completo. Los tubos se incubaron a 37°C en plano inclinado para favorecer la adherencia de los trofozoítos del parásito a las paredes del tubo. Diariamente se realizó la observación microscópica de los tubos para determinar de manera apreciativa el estado de crecimiento de los trofozoítos y el tiempo adecuado para su resiembra. Este tiempo se seleccionó como el momento cuando casi la totalidad de las paredes de los tubos de cultivo se encontraban cubiertas con los trofozoítos. Los trofozoítos se cosecharon en este estado, desprendiéndolos del vidrio por inmersión de los tubos en una mezcla de agua con hielo por 5 a 10 min.

2.14.3 Solución estándar de NaAsO_2 .

Se preparó una solución estándar de NaAsO_2 (Sigma S7400) con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta solución se esterilizó por filtración en membranas de nitrocelulosa de poro 0.45 μm , se recolectó en tubos estériles y se almacenó en refrigeración a 4°C por no más de una semana antes de su uso.

El medio TYI-S-33 completo conteniendo As se preparó añadiendo los volúmenes necesarios de la solución stock de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NaAsO_2 para obtener concentraciones finales de 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 750 y 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ de NaAsO_2 .

Los medios conteniendo NaAsO_2 y el medio control libre de As, se distribuyeron en tubos en un volumen de 6 mL con el uso de una jeringa de repetición.

2.15 ANALISIS ESTADISTICO.

Para determinación de la existencia de diferencias entre las medidas de los grupos de datos obtenidos para los diferentes tratamientos experimentales, se utilizó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Para identificar los pares de medias con diferencias significantes se utilizó la prueba de Tukey de comparación múltiple de medidas.

La existencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos a que fueron sometidos los cultivos de trofozoítos, se determinaron mediante análisis de covarianza (ANCOVA) utilizando la concentración de As como factor variable y el día de cultivo como covariable. Las diferencias entre puntos específicos de los diversos tratamientos se determinaron mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, previa identificación de diferencias entre grupos mediante ANCOVA.

Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con ayuda del paquete computacional MINITAB versión 7.1 (Minitab Inc. PA., USA).

CAPITULO

3

RESULTADOS

3.1 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CON As SOBRE LOS MECANISMOS INMUNITARIOS.

Con el fin de obtener la validez necesaria de nuestros estudios del efecto de la intoxicación oral crónica de ratones con NaNO_2 sobre diferentes mecanismos inmunitarios, se cubrieron varios aspectos de los parámetros descritos en el esquema TIER I, que corresponden a Patología, Inmunidad celular e Inmunidad humoral.

3.1.1 Determinación de As total en órganos.

Para evaluar las concentraciones de As alcanzadas en los tejidos, se midió la concentración de As total en el bazo y el intestino de los ratones que fueron mantenidos con agua libre de tóxicos o conteniendo 50, 125 ó 250 $\mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 . La concentración de As total cuantificada en el bazo y segmentos de intestino delgado de los ratones, fue proporcional a la concentración de NaAsO_2 presente en el agua ingerida por los animales. Sin embargo, en todas las ocasiones, la concentración

de As total por gramo de tejido medida en los segmentos de intestino delgado, fue superior a la encontrada para cada uno de los bazo (Tabla 1). Los resultados obtenidos permitieron establecer grupos de intoxicación, en base a las claras diferencias entre las concentraciones de As presentes en los tejidos de los diferentes grupos experimentales incluidos en el estudio.

La concentración de As por unidad de volumen de intestino se calculó para cada uno de los grupos experimentales de ratones a partir de los datos obtenidos mediante la medición de la concentración de As total por unidad de peso del intestino. Los resultados mostraron que el rango de la concentración calculada de As en el intestino de los ratones intoxicados es de 82 a 368 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido ó de 12 a 68 μg por cada litro de intestino (Tabla 2).

**Tabla 2. CONCENTRACIÓN DE As EN TEJIDOS DE RATONES INTOXICADOS
CON NaAsO₂**

GRUPO	BAZO (ng As/ g tejido)	Intestino (ng As/g tejido)	Intestino µg As/L
Control	2.35 (± 2.29)	0.028 (± 0.049)	0.0052
50 µg/mL	50.73 (± 23.96)	82.80 (±2.66)	12.75
125 µg/mL	82.14 (± 12.86)	128.98 (± 20.87)	28.46
250 µg/mL	179.36 (± 28.75)	368.28 (± 43.33)	67.24

Concentraciones de As total en bazo e intestino de ratones. Secciones de bazo e intestino e ratones que ingirieron 50, 125 o 250 µg/mL de NaAsO₂ durante 45 días, fueron procesadas para la determinación de As mediante espectrofotometría de absorción atómica. La concentración de As expresada en µg/L de intestino fue calculada a partir de los datos obtenidos de la concentración de As por gramo de tejido, tal como se describe en la sección de métodos.

3.1.2 Efecto de la intoxicación con As sobre mecanismos inmunitarios.

3.1.2.1 Patología.

Los parámetros de evaluación de los efectos patológicos causados por intoxicación crónica de los ratones con NaAsO₂ fueron : 1) el peso corporal de los ratones, 2) la relación entre los pesos del bazo y el peso corporal y 3) el análisis histopatológico del bazo y timo de los ratones.

3.1.2.1.1 Efecto del As sobre el peso corporal y la relación peso del bazo / peso corporal.

La ingestión durante 45 días de agua conteniendo 50 y con 125 µg/mL de NaAsO₂ no alteró el desarrollo de los ratones en términos del peso corporal comparado con el grupo control (ratones que ingirieron agua sin tóxico). En contraste, observamos que la concentración de 250 µg/mL del tóxico causó una disminución significativa de alrededor del 15% en la relación de pesos corporales antes y después de la ingestión de As (Figura 1). Estos resultados muestran que la intoxicación con 250 µg/mL de NaAsO₂ causa un efecto tóxico sistémico; por ello, la concentración de 250 µg/mL del tóxico fue subsecuentemente utilizada como referencia de un efecto sistémico, mientras que concentraciones menores fueron consideradas de mayor relevancia para nuestros estudios de inmunotoxicidad.

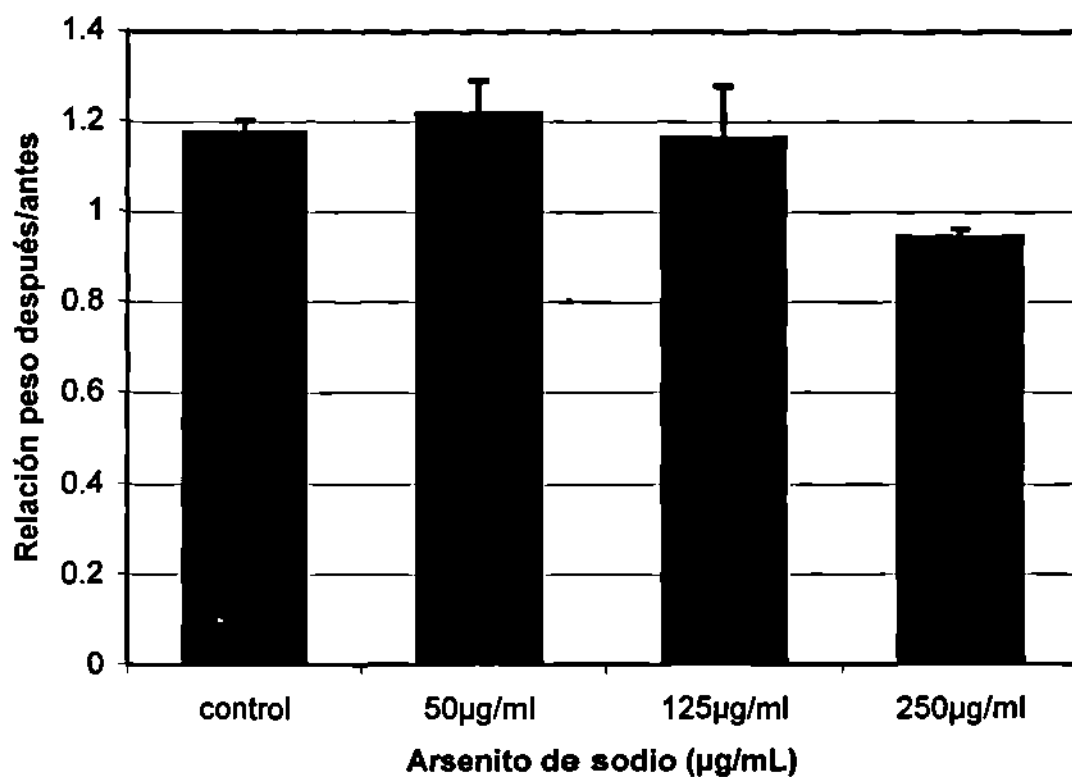


Figura 1. Efecto de la intoxicación con As sobre el peso corporal de ratones. Ratones BALB/c se mantuvieron durante 45 días con alimentación normal y agua conteniendo 0, 50, 125 ó 250 µg/mL de NaAsNO₂ en el agua para beber y se pesaron antes y al término del período de intoxicación.

La relación peso del bazo/peso corporal no varió en aquellos ratones que ingirieron agua conteniendo 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o concentraciones menores de NaAsO_2 comparado con ratones del grupo control. En contraste, la ingestión de agua conteniendo 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NaAsO_2 , causó una disminución significativa de alrededor del 35% en relación peso del bazo/peso corporal en comparación con ratones que recibieron agua libre del tóxico (Tabla 3).

**Tabla 3. RELACIÓN DEL PESO DEL BAZO vs PESO CORPORAL EN RATONES
INTOXICADOS CON NaAsO₂.**

GRUPOS DE RATONES	BAZO g/100 g PESO CORPORAL
Control	0.378 (\pm 0.068)
50 μ g/mL	0.368 (\pm 0.092)
125 μ g/mL	0.275 (\pm 0.167)
250 μ g/mL	0.242 (\pm 0.033)*

Ratones BALB/c fueron intoxicados con diferentes concentraciones de NaAsO₂ en el agua para beber por 45 días. Los valores representan los promedios de las relaciones expresados como porcentaje para cada ratón \pm desviación estándar. El asterisco denota valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo control (P < 0.05).

3.1.2.1.2 Análisis histopatológico del efecto del As sobre tejido linfoide.

- **Histología del Timo.**

La histología tímica no mostró alteraciones en ninguno de los grupos de ratones intoxicados en comparación con ratones que se mantuvieron sin el tóxico. En todos los casos la histología de este órgano mostró los componentes característicos del timo: corteza densamente infiltrada de linfocitos, células reticulares epiteliales tanto en la corteza como en la médula, algunos corpúsculos de Hassal, principalmente en las regiones medulares (Figura 2).

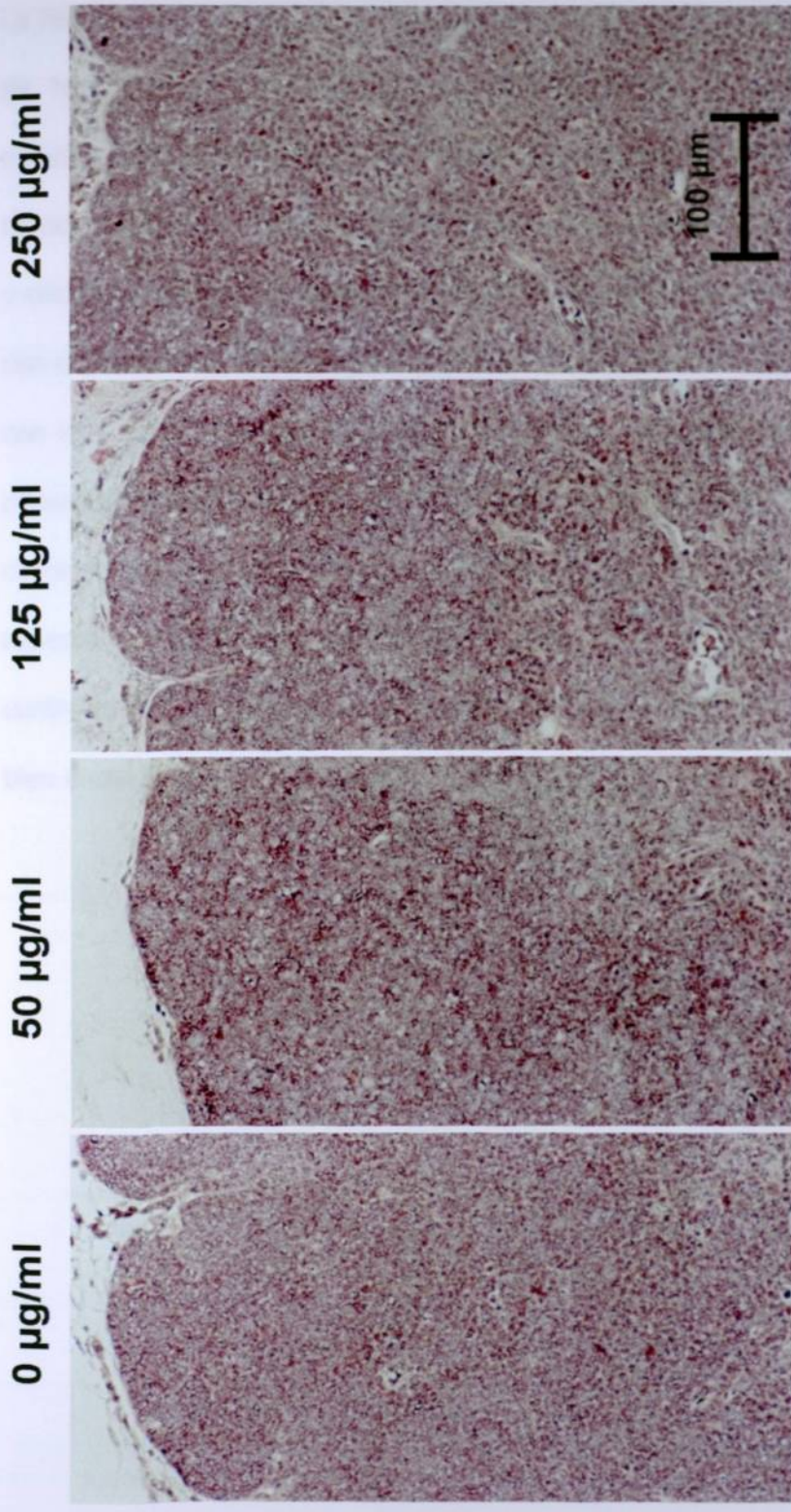


Figura 2. Histología tímica de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO₂. Ratones BALB/c fueron mantenidos por 45 días ingiriendo 0, 50, 125 o 250 µg/mL de NaAsO₂, al final del tratamiento los timos de los animales fueron procesados con técnicas histológicas convencionales. Secciones de entre 4 y 6 µm fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina y analizadas microscópicamente.

- Histología esplénica.

La histopatología esplénica en ratones sanos (Figura 3) mostró una clara demarcación de las regiones de pulpa blanca conteniendo el conjunto de tejido linfoide y constituyendo la mayor parte de las áreas observadas del bazo. La pulpa roja mostró el tejido reticular con sus típicos elementos celulares sanguíneos (eritrocitos, granulocitos y células plasmáticas y megacariocitos prominentes). Los grupos de ratones intoxicados con cualquiera de las dosis de As, presentaron alteraciones de la arquitectura esplénica con una disminución de entre el 20 al 50% en la extensión de la pulpa blanca que dependió de la dosis utilizada para intoxicar a los ratones. La pulpa blanca en estos casos se observó como regiones más delimitadas y concéntricas que representaron un aspecto moteado; en estos bazos la pulpa roja fue más prominente que en los controles aunque no es claro si esto se debió solo a la disminución de la pulpa blanca o bien a una hiperplasia de la roja.

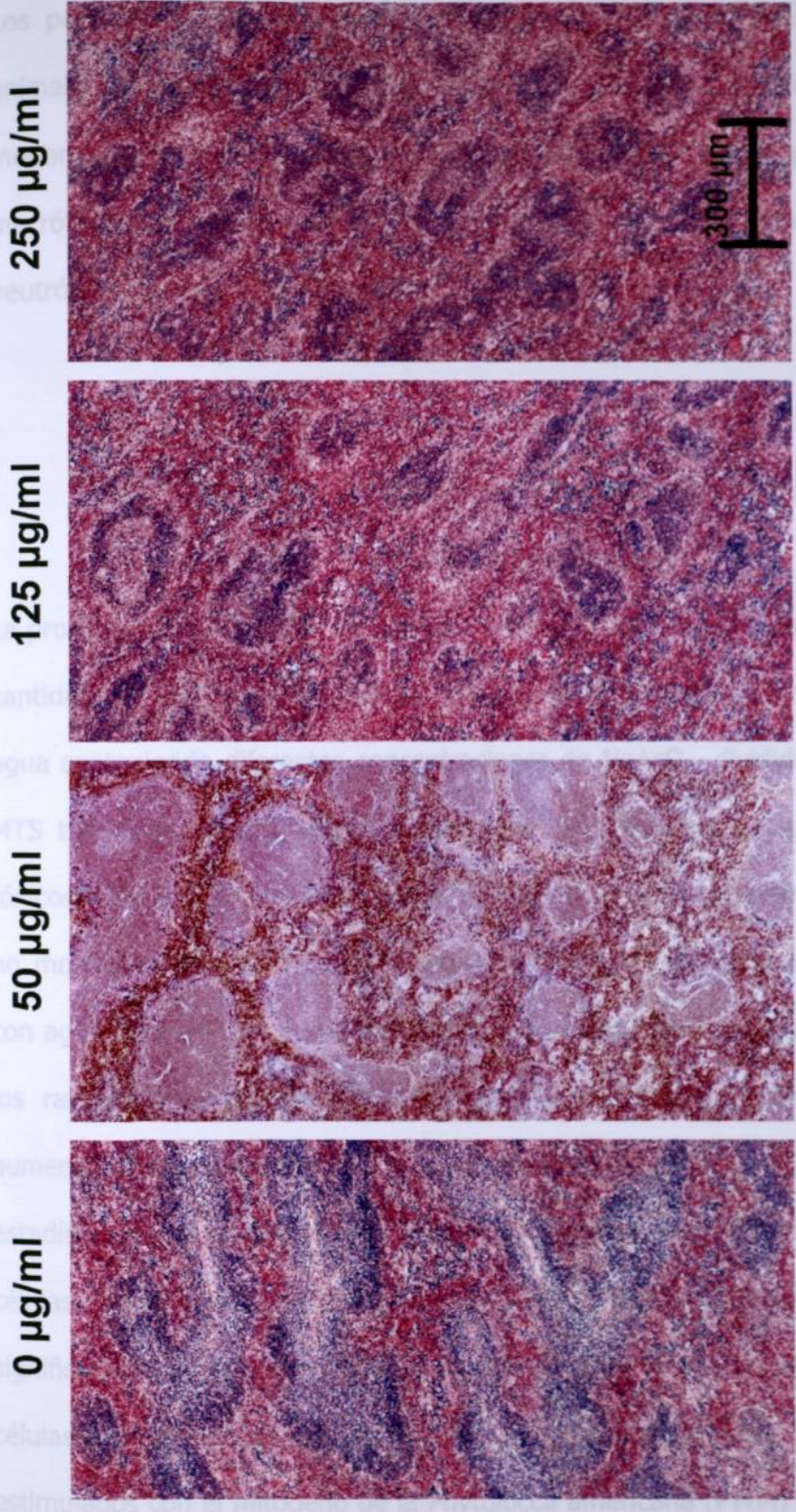


Figura 3. Histología esplénica de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO₂. Ratones BALB/c fueron mantenidos por 45 días ingiriendo 0, 50, 125 o 250 µg/mL de NaAsO₂, al final del tratamiento los bazos de los animales fueron procesados con técnicas histológicas convencionales de la misma manera que para el timo. Secciones de entre 4 y 6 µm fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina y analizadas microscópicamente.

3.1.2.2 Inmunidad Celular

Los parámetros evaluados como índices de función de la inmunidad celular de los animales de experimentación incluyeron 1) la capacidad proliferativa de las células mononucleares (CMN) de sangre periférica; 2) la capacidad de producción de NO por macrófagos peritoneales y 3) la capacidad de realizar estallido respiratorio por neutrófilos de sangre periférica.

3.1.2.2.1 Efecto de la intoxicación con As sobre la proliferación de CMN.

La proliferación de las CMN se expresó como un índice que consistió en la relación de la cantidad de MTS transformado por las células procedentes de ratones que ingirieron agua conteniendo diferentes concentraciones de NaAsO_2 , dividida entre la cantidad de MTS transformado por células procedentes de ratones que ingirieron agua libre de tóxicos. Este índice observado en las células en reposo no estimuladas con mitógeno, no mostró diferencias estadísticamente significativas en ratones que se mantuvieron con agua libre de tóxico en relación con los tratados con NaAsO_2 . Si bien en ocasiones los ratones tratados con 50 y 125 $\mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 mostraron disminución y aumento, respectivamente, en la transformación de MTS, esos cambios no resultaron estadísticamente significativos. Sorprendentemente, la transformación de MTS por células estimuladas con ConA , tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas, aunque nuevamente se observó una mayor transformación de MTS por células procedentes de ratones tratados con 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 . En cultivos estimulados con el mitógeno de la *Phytolacca americana* (PWM) igualmente se observó

un incremento en la transformación de MTS por células procedentes de ratones intoxicados con 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del tóxico, en este caso esta diferencia si fue estadísticamente significativa (Figura 4).

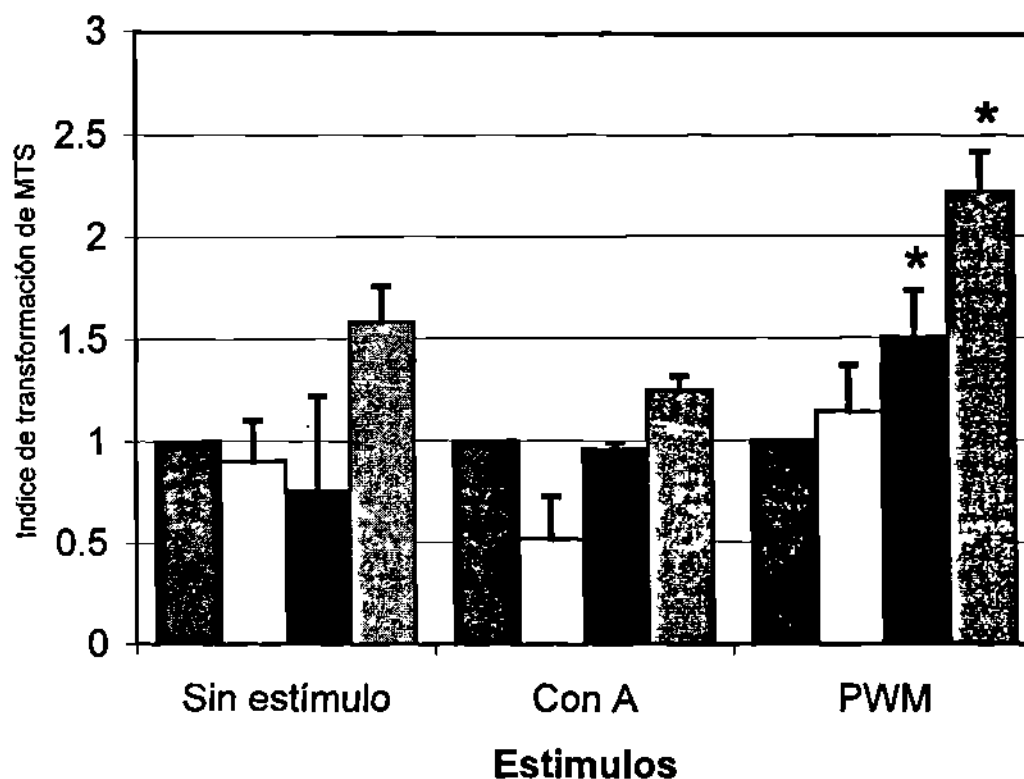


Figura 4. Índice de proliferación de CMN de bazo de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO₂. La capacidad de transformación de MTS se determinó *in vitro* tanto en células en reposo (sin estímulo) como en células estimuladas con ConA o PWM. Las barras representan los promedios \pm desviación estándar de la relación de valores para cada estímulo. El asterisco denota los valores significativamente diferentes al valor del grupo control ($P < 0.05$). Las barras grises oscuro representan los índices de transformación de MTS por las CMN obtenidas del grupo control, las barras blancas corresponden al grupo intoxicado con 50 µg/mL, las barras negras corresponden al grupo intoxicado con 125 µg/mL y las barras gris claro corresponden al grupo intoxicado con 250 µg/mL.

3.1.2.2 Efecto de la intoxicación con As sobre la producción de NO por macrófagos peritoneales.

El índice de NO por las células peritoneales definido por nosotros como la producción de NO por macrófagos procedentes de animales que ingirieron agua conteniendo NaAsO_2 , dividido por la producción de NO por las células de ratones que ingirieron agua libre de tóxicos, mostró algunos cambios. En comparación con células derivadas de ratones mantenidos libres de tóxicos, la producción de NO por células peritoneales de ratones intoxicados con $50 \mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 no mostró cambios estadísticamente significantes en cultivos realizados tanto en ausencia de estímulos con LPS. Las células derivadas de ratones intoxicados con $125 \mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 , mostraron aumento en la producción de NO sin embargo, este aumento resultó significativo solo en las células estimuladas con LPS. En contraste la producción de NO por células derivadas de ratones intoxicados con $250 \mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 fue sustancial y significativamente menor que las células procedentes de ratones que no fueron expuestos, tanto al ser estimuladas o no con LPS (Figura 5).

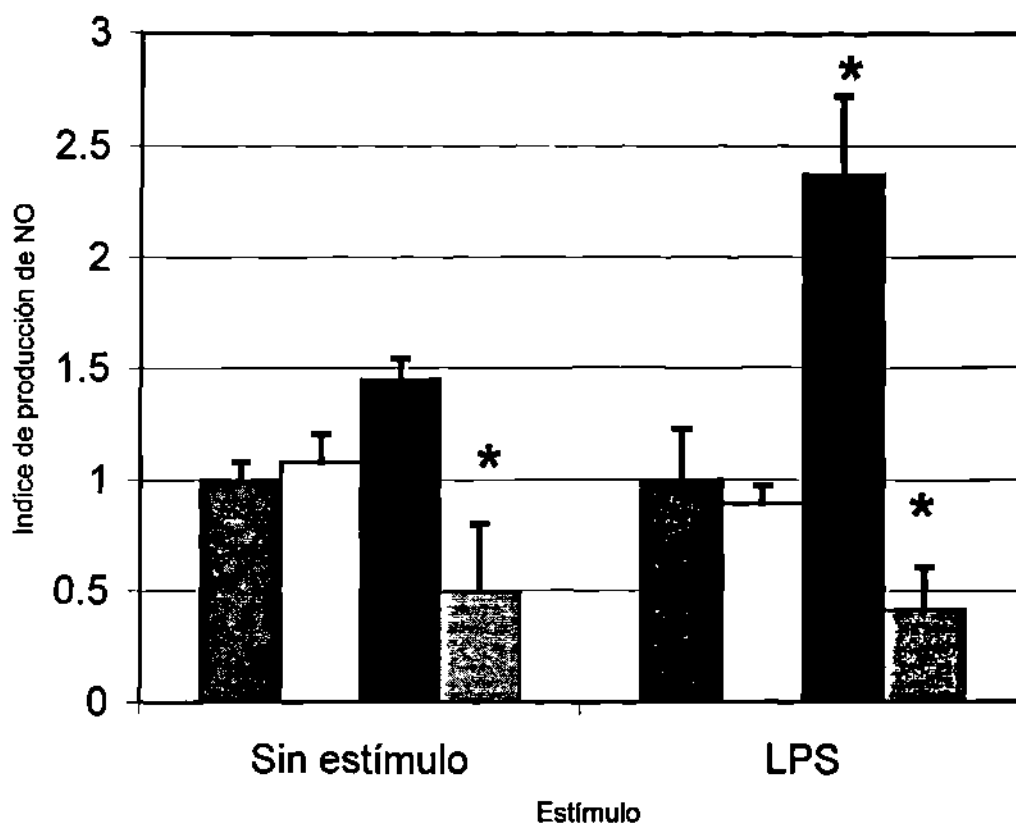


Figura 5. Índice de producción de NO por macrófagos peritoneales de ratones BALB/c intoxicados con NaAsO₂. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de las determinaciones colorimétricas del contenido de NO en el medio de cultivo, tanto en células en reposo (Sin estímulo) como estimuladas con LPS. El asterisco denota valores significativamente diferentes al valor del grupo control ($P < 0.05$). Las barras gris oscuro representan los índices de transformación de MTS por las CMN obtenidas del grupo control, barras blancas al grupo 50 µg/mL, barras negras grupo 125 µg/mL, barras gris claro al grupo 250 µg/mL.

3.1.2.2.3 Efecto de la intoxicación con As sobre la capacidad de los neutrófilos para realizar estallido respiratorio.

La capacidad de los neutrófilos de realizar estallido respiratorio, medida como intensidad de fluorescencia media no se afectó significativamente en las células de ratones que ingirieron agua con cualquiera de las dosis de NaAsO_2 , en comparación con los controles (Figura 6). Estos mismos resultados se obtuvieron en tres experimentos independientes y podría deberse a la rápida eliminación de As de la corriente sanguínea por lo que las células circulantes no se verían afectadas.

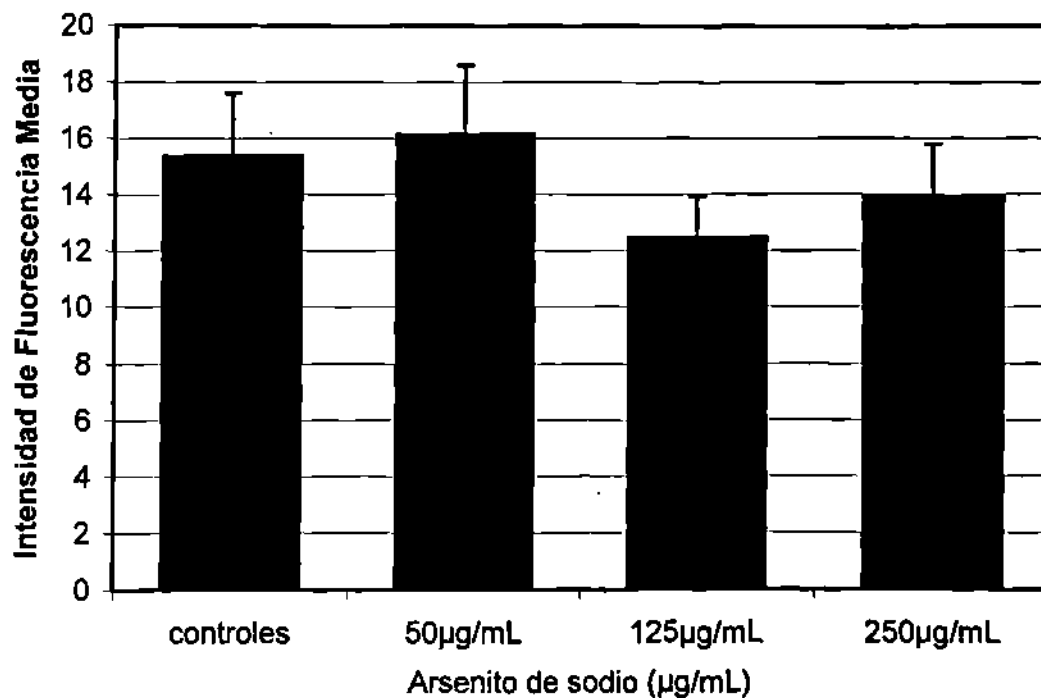


Figura 6. Intensidad de fluorescencia media celular producida por efecto del estallido respiratorio de células PMN obtenidas de sangre periférica de ratones intoxicados con NaAsO₂. Ratones BALB/c se mantuvieron por 45 días ingiriendo agua conteniendo 0, 50, 125 o 250 µg/mL de NaAsO₂. Al final del período de intoxicación se determinó la capacidad de las células PMN para realizar estallido respiratorio por estimulación con PMA. Las barras representan el promedio ± desviación estándar de las mediciones de intensidad de fluorescencia media realizadas en células estimuladas con PMA obtenidas de ratones no intoxicados e intoxicados.

3.1.2.3 Inmunidad Humoral.

3.1.2.3.1 Determinación del efecto de la intoxicación con As sobre la producción de IgG total.

Para determinar si la intoxicación con As también presenta efectos sobre las respuestas inmunes humorales, se desarrolló un método de inmunoabsorción enzimático (ELISA) para la medición de inmunoglobulina G sérica en los ratones usados como modelo animal de intoxicación. Se realizó la determinación de la concentración de IgG sérica total presente en ratones normales y de ratones que fueron mantenidos durante 45 días con agua conteniendo 50, 125 ó 250 µg/mL de NaAsO₂.

Como se muestra en la Figura 7, se observó que en relación a ratones que ingirieron agua libre de tóxicos, la concentración de IgG total presente en el suero de ratones que ingirieron agua conteniendo As, presentó una pequeña disminución que pareció depender de la concentración de NaAsO₂. Sin embargo, aunque resultados idénticos fueron obtenidos en dos experimentos independientes, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre animales normales e intoxicados.

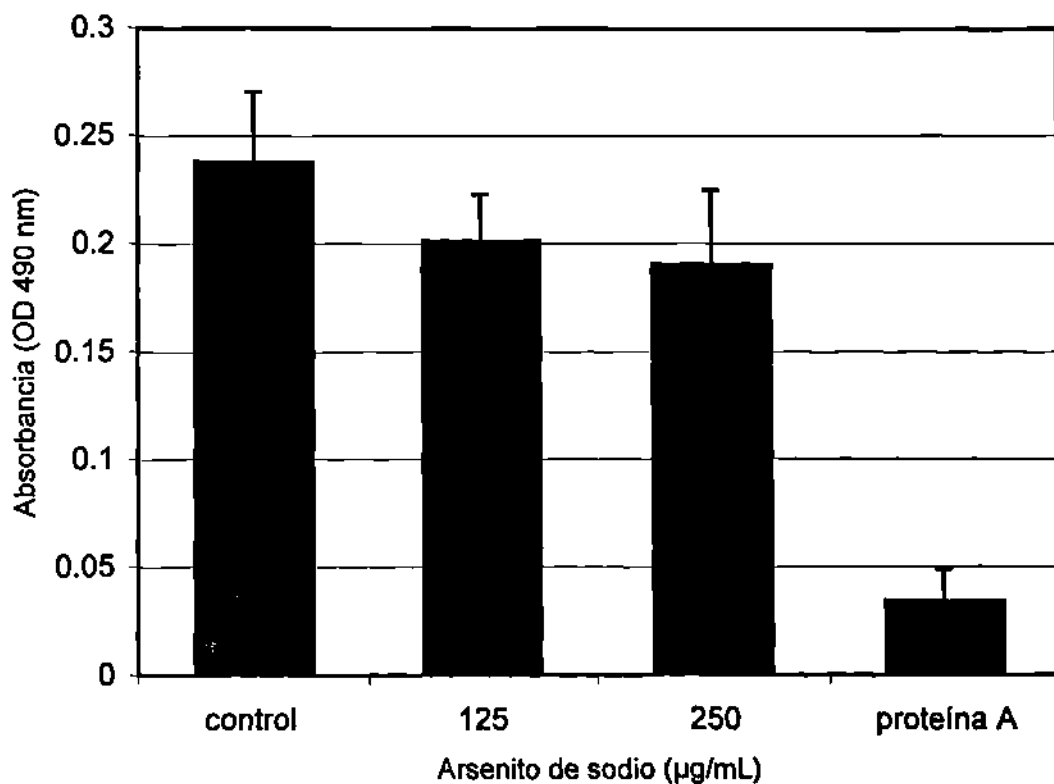


Figura 7. Niveles relativos de IgG sérica total en el suero de ratones BALB/c que fueron intoxicados con NaAsO₂. Las barras corresponden a valores promedio \pm desviación estándar de las respuestas de color obtenidas a través de la técnica de ELISA. Proteína A: suero normal absorbido con proteína A.

3.1.2.3.2 Producción de anticuerpos IgG específicos para ovoalbúmina.

La producción de anticuerpos estimulada por inmunización con ovoalbúmina por ratones que ingirieron agua conteniendo As, disminuyó notablemente en relación a ratones que *no* ingirieron el tóxico. El efecto mostró dependencia de la concentración de NaAsO₂ ingerida, observándose en los ratones tratados con 125 µg/mL y 250 µg/mL de NaAsO₂ una disminución de un 24% y un 52%, respectivamente, en las respuestas de color obtenidas en la prueba de ELISA a la dilución de 1:10,000 del suero, con respecto al grupo control (Figura 8).

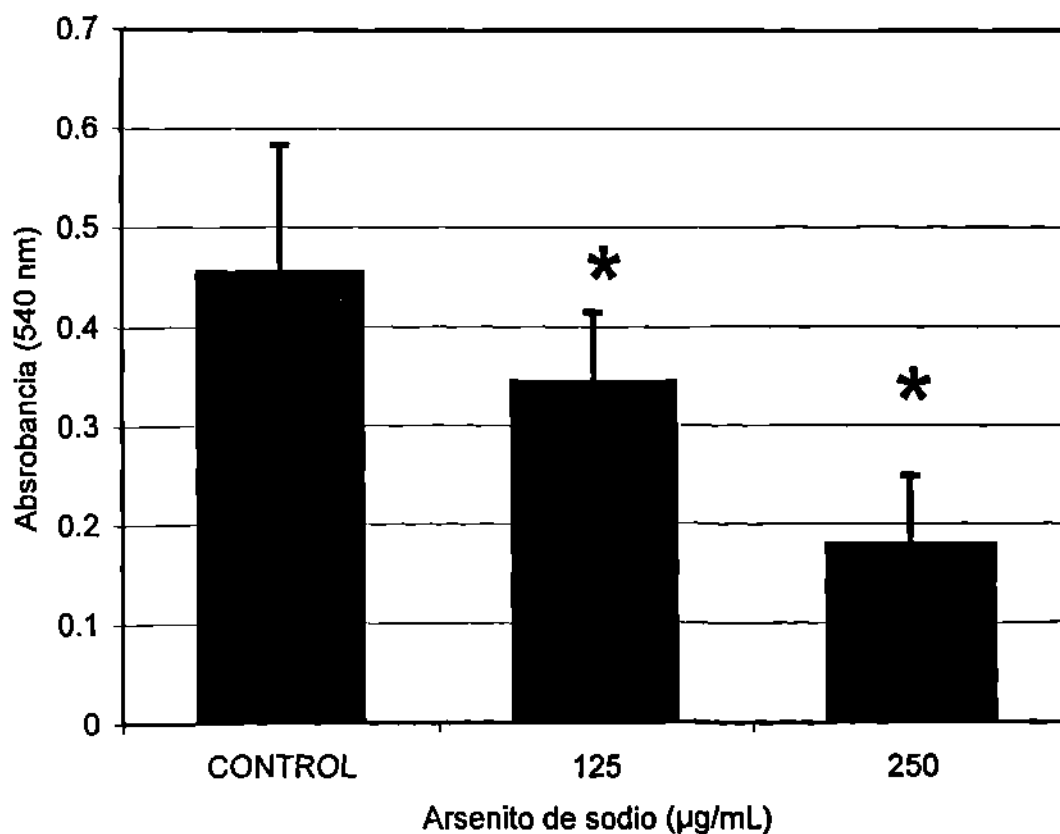


Figura 8. Niveles relativos de IgG sérica específica anti-ovoalbúmina medidos después de la inmunización con ovoalbúmina en ratones BALB/c intoxicados con 125 y 250 µg/mL de NaAsO₂. Las barras representan la media de los valores obtenidos ± desviación estándar. Los asteriscos denotan valores estadísticamente significativos (P<0.05) con respecto al control.

3.2 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON As SOBRE LA GIARDOSIS MURINA.

Para evaluar los efectos de la ingestión de As sobre la capacidad de eliminación de los agentes infecciosos establecimos la infección aguda de giardiosis murina tanto en ratones BALB/c que son inmunológicamente competentes, como la infección crónica en la cepa CBA/CanH(XI^d) la cual presenta una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X. Además determinamos el desarrollo de la infección giardiósica en la cepa BALB/c de ratones inmunocompetentes tras el tratamiento con dexametasona con el fin de determinar el efecto de la exposición a agentes inmunosupresores (control positivo de inmunosupresión). Así mismo, determinamos el efecto de la intoxicación crónica con As sobre el curso y gravedad de la giardiosis en la misma cepa de ratones BALB/c.

3.2.1 Giardiosis aguda.

En nuestros experimentos, la infección de ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de edad con quistes de *G. muris* se caracterizó por un inicio de la excreción de quistes entre 2 a 5 días después de la inoculación. El pico máximo de excreción fue observado entre 6 a 10 días posteriores a la inoculación del parásito, con un rango de entre 1 y 1.5×10^6 quistes por gramo de heces secas (Figura 9).

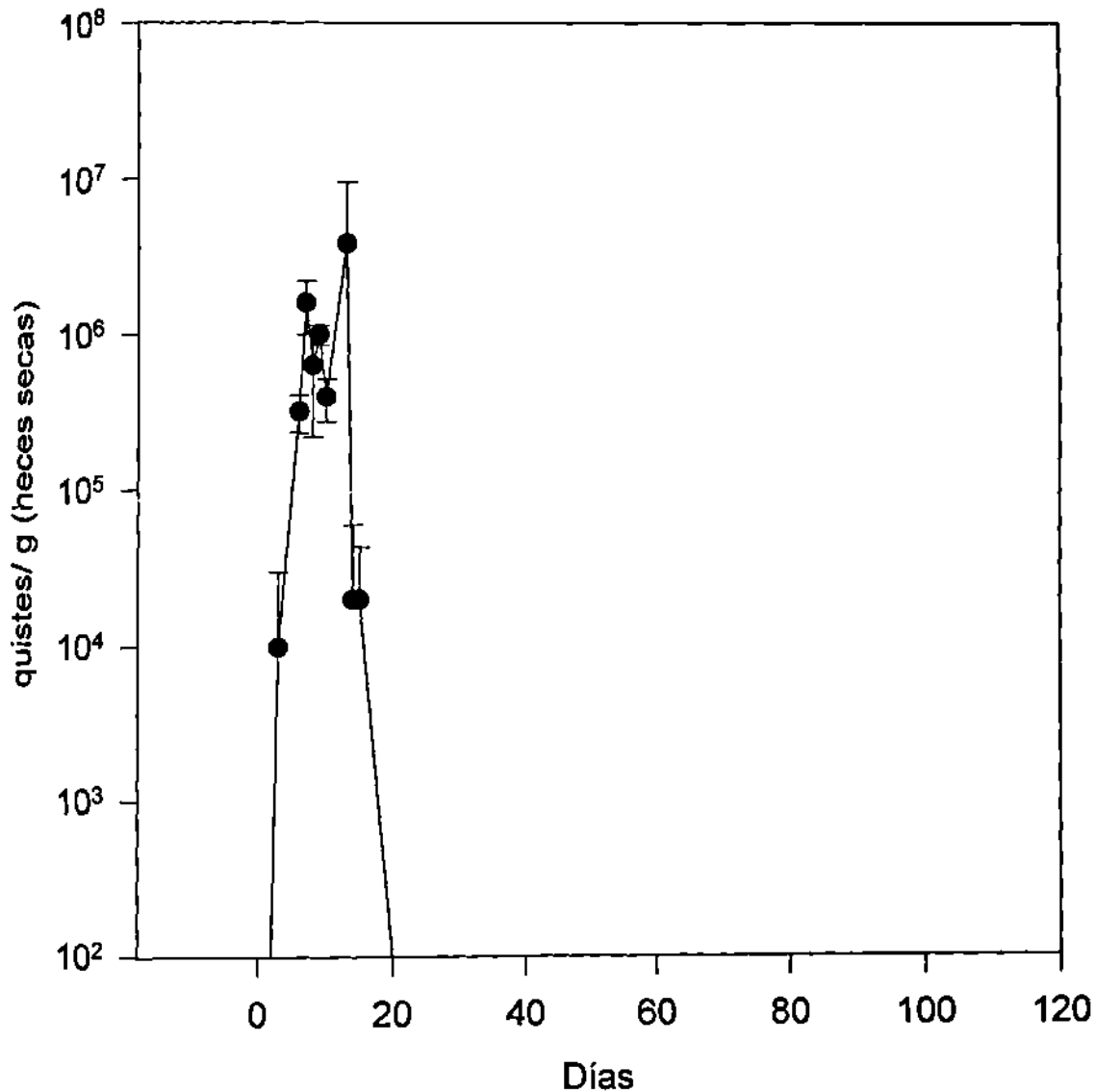


Figura 9. Patrón de excreción de quistes en el modelo de infección con *G. muris* en la cepa de ratones BALB/c. Ratones BALB/c normales (n=4) de 4 a 6 semanas de edad se infectaron intragástricamente con 1×10^5 quistes de *G. muris*. La excreción de quistes se monitoreó diariamente mediante su aislamiento en sacarosa, cuantificación en hematocitómetro y determinación de su viabilidad mediante microscopía de fluorescencia. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar.

3.2.2 Giardiosis crónica.

La excreción de quistes por ratones de la cepa CBA/CaHN (X^{td}) mostró un patrón diferente a lo observado en el modelo agudo. El inicio de la excreción de quistes fue observado entre los días 3 y 5 después del inicio de la infección. El pico de máxima excreción de quistes fue observado aproximadamente a los 7 días de iniciada la infección y fue del orden de 4.5×10^6 quistes por gramos de heces secas (Figura 10). El número de quistes excretados en las heces disminuyó después de este periodo, mostrando pequeños picos de excreción o recrudescencias a lo largo de la infección. La excreción de quistes fue monitoreada solamente durante 94 días después de la infección de los ratones; sin embargo, en ocasiones los quistes en las heces pudieron ser detectados hasta 5 meses después de iniciada la infección con el parásito.

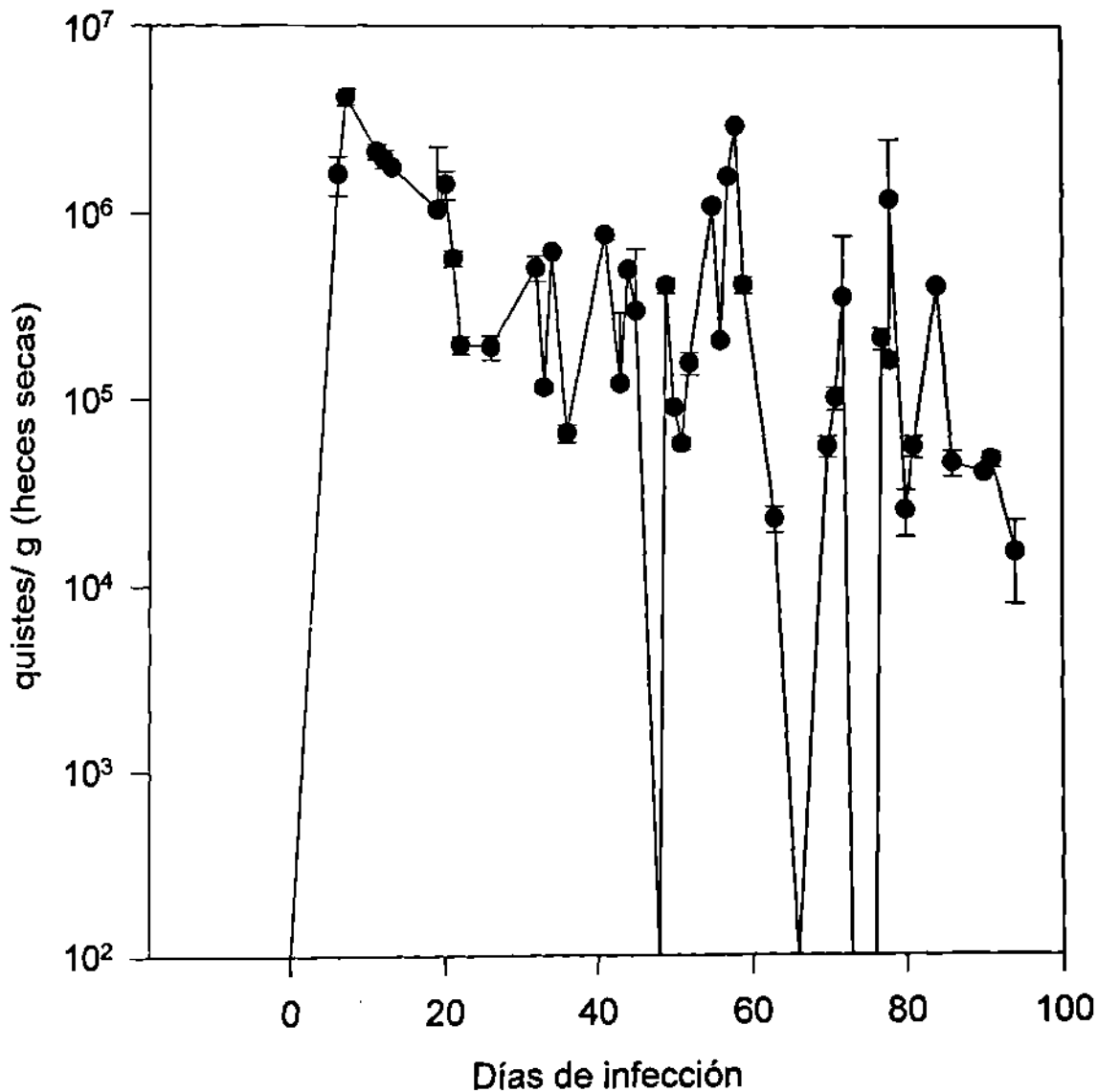


Figura 10. Patrón de excreción de quistes en el modelo de infección crónica con *G. muris* en ratones de la cepa CBA/CaHN (Xc^{ld}). Los ratones (n=4) se inocularon con 1×10^5 quistes de *G. muris* por vía intragástrica. La excreción de quistes se monitoreó diariamente mediante su aislamiento en sacarosa, su cuantificación en hematocítómetro y determinación de su viabilidad mediante microscopía de fluorescencia. Los valores representan el promedio \pm desviación estandar.

3.2.3 Efecto de la inmunosupresión inducida por esteroides sobre la infección primaria.

La infección en ratones que ingirieron agua conteniendo fosfato de dexametasona mostró un aumento en la cantidad de quistes excretados, en comparación con ratones normales no tratados con el esteroide; sin embargo, no existieron diferencias en el inicio de la excreción de quistes ó el tiempo de máxima excreción. Los niveles de excreción de quistes fueron al menos una orden de magnitud superiores a los observados en ratones no inmunosuprimidos, llegando a rangos de entre 10^7 a 10^8 quistes por gramo de heces secas. Adicionalmente, el período de excreción de los quistes se prolongó por más de 30 días manteniéndose con niveles de uno a dos órdenes de magnitud superiores al límite de detección de nuestros ensayos (10^3 quistes por gramo de heces secas) (Figura 11).

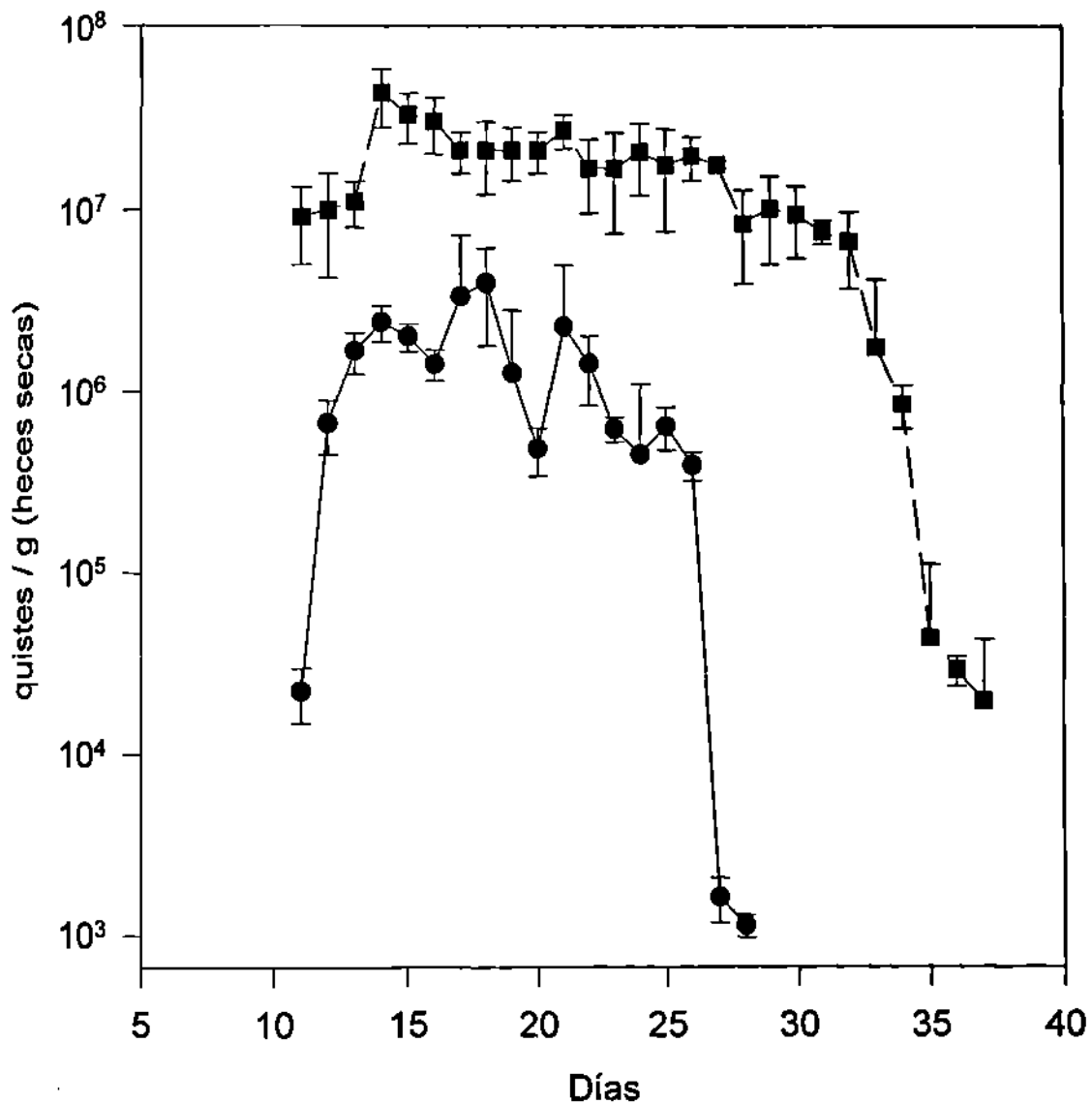


Figura 11. Efecto de la inmunosupresión inducida por dexametasona en ratones infectados con *G. muris*. Se muestra el patrón de excreción de quistes de *G. muris* en ratones BALB/c normales (■) (n=2) e inmunosuprimidos por ingestión de agua conteniendo con 10 µg/mL de dexametasona (DMZ) en el agua de beber durante 7 días (●). Los valores representan promedios ± desviación estándar.

3.2.4 Reactivación de la Infección.

La inoculación de 100 $\mu\text{g/mL}$ de Dexametasona por vía intraperitoneal a ratones normales a los que se permitió que eliminaran de manera natural la infección con *G. muris*, ocasionó la aparición adicional de quistes al día siguiente de administración del fármaco. La duración de la excreción fue de 6 días, presentando un pico máximo de excreción al segundo día posterior a la inoculación. Sin embargo, tanto la excreción de quistes como la viabilidad de los mismos se vio disminuida en relación a lo observado durante la infección primaria (Figura 12).

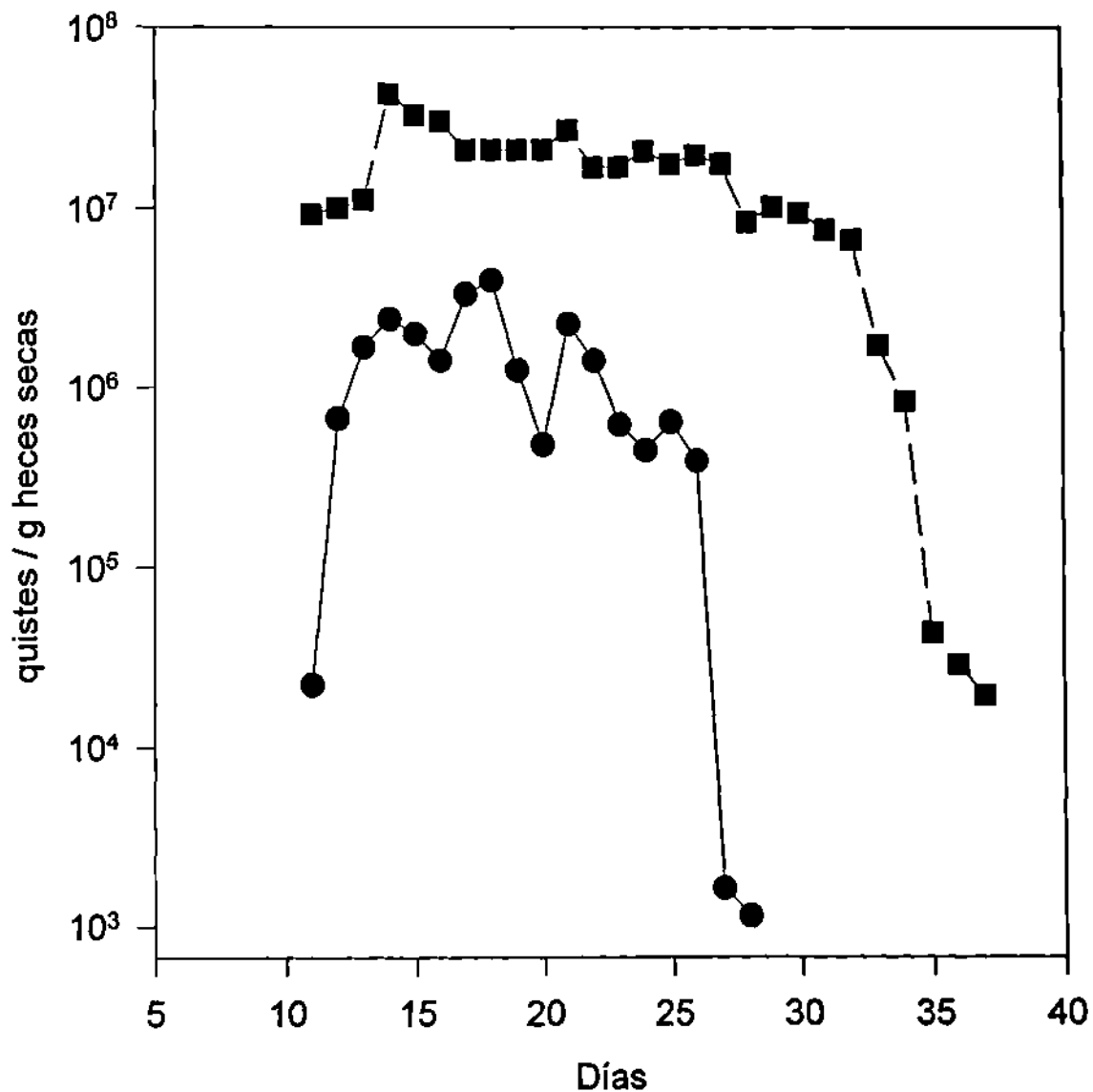


Figura 12. Reactivación de la infección causada por *G. muris* en ratones BALB/c tras la inoculación intraperitoneal de 100 μ g de dexametasona, posterior al cese de excreción de quistes de la infección primaria. Ratones BALB/c ($n=3$) se infectaron con quistes de *G. muris*, se permitió que eliminaran naturalmente la infección y se inocularon intraperitonealmente con 100 μ g de dexametasona. La excreción de quistes en heces se monitoreó de la manera habitual mediante cuantificación en hematocitómetro y determinación de viabilidad mediante microscopía de fluorescencia. ● = infección primaria ○ = reactivación después de la inoculación con dexametasona.

3.2.5 Efecto del As sobre la giardiosis murina.

3.2.5.1 Giardiosis primaria.

La infección giardiósica primaria en ratones BALB/c que se mantuvieron con agua libre de NaAsO₂ a lo largo del experimento (grupo control), mostró el patrón usual descrito anteriormente, con el inicio de la excreción de quistes entre los días 6 y 10 post-inoculación y un pico máximo de excreción de quistes que apareció entre los días 6 y 8 con concentraciones de alrededor de 10⁶ quistes por gramo de heces secas. La excreción de quistes tuvo una duración total de 26 a 30 días, como puede observarse (Figura 13). El curso y gravedad de la infección en ratones que fueron intoxicados con 50 µg/mL de NaAsO₂ en el agua para beber, no mostró diferencias substanciales en comparación con los ratones no intoxicados. Sin embargo, estos últimos ratones mostraron algunos días en que la excreción de quistes resultó ligeramente superior a la de los ratones no intoxicados con As, aunque sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. Los ratones intoxicados con 125 µg/mL de NaAsO₂, exhibieron un patrón de excreción de quistes similar al grupo control sólo durante las dos primeras semanas de infección. Sin embargo, a partir de la semana 3, la excreción de quistes fue muy variable, mostrando períodos alternados de excreción en cantidades que llegaron a ser similares a las observadas en los controles, seguidos por períodos de ausencia total de excreción. En estos ratones, la excreción de quistes finalizó terminada la tercera semana de infección, manteniéndose así hasta finalizados nuestros experimentos. EL curso y gravedad de la infección en ratones que fueron intoxicados con 250 µg/mL de NaAsO₂, mostró notables diferencias en relación a los ratones no intoxicados: aunque en la primera semana de infección el patrón fue similar al observado en los ratones

control, a partir del séptimo día la excreción de quistes fue muy variable, mostrando días de ausencia de quistes detectables en las heces, alternados con días de excreción similar a la observada en los ratones controles. En este caso la excreción de quistes concluyó al cabo de 18 a 20 días posteriores a la infección. Resultados substancialmente similares fueron observados en tres experimentos independientes.

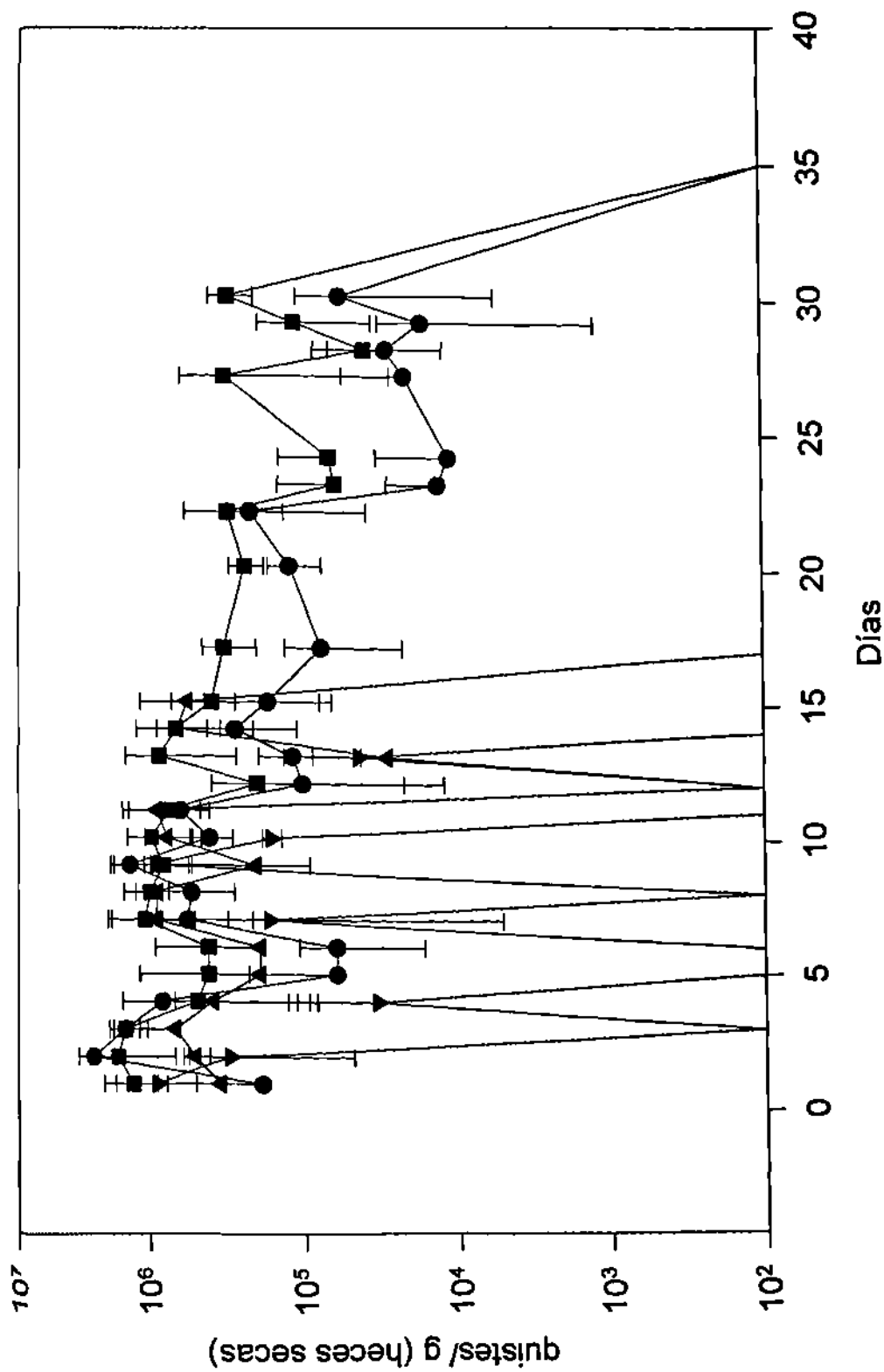


Figura 13. Patrones de excreción de quistes de *G. muris* de ratones BALB/c intoxicados con diferentes concentraciones de NaAsO_2 . Ratones BALB/c se mantuvieron con 0, 50, 125 ó 250 µg/mL en el agua para beber durante 45 días. Transcurrido este período los ratones se infectaron con 1×10^5 quistes de *G. muris* por vía intragástrica. La excreción de quistes se monitoreó diariamente mediante su aislamiento en sacarosa, su cuantificación en hematocitómetro y determinación de su viabilidad mediante microscopia de fluorescencia. Los valores representan promedios \pm desviación estándar. ● = control, ■ = 50 µg/mL, ▲ = 125 µg/mL, ▼ = 250 µg/mL.

3.2.5.2 Giardiosis secundaria.

La reinfección de ratones después de eliminar la infección primaria por tratamiento con metronidazol, mostró que sólo un ratón de cada grupo experimental de ratones que recibió 50 o 125 $\mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 , así como del grupo control, presentaron infección con el parásito. Sin embargo, en este caso el inicio de la excreción de quistes ocurrió entre los días 1 y 2 posterior a la reinfección. El nivel máximo de excreción de quistes se encontró en el orden de 1.27 a 6.7×10^4 quistes/g de heces secas. La infección fue totalmente eliminada por todos los ratones en el día 7 posterior a la infección (Figura 14).

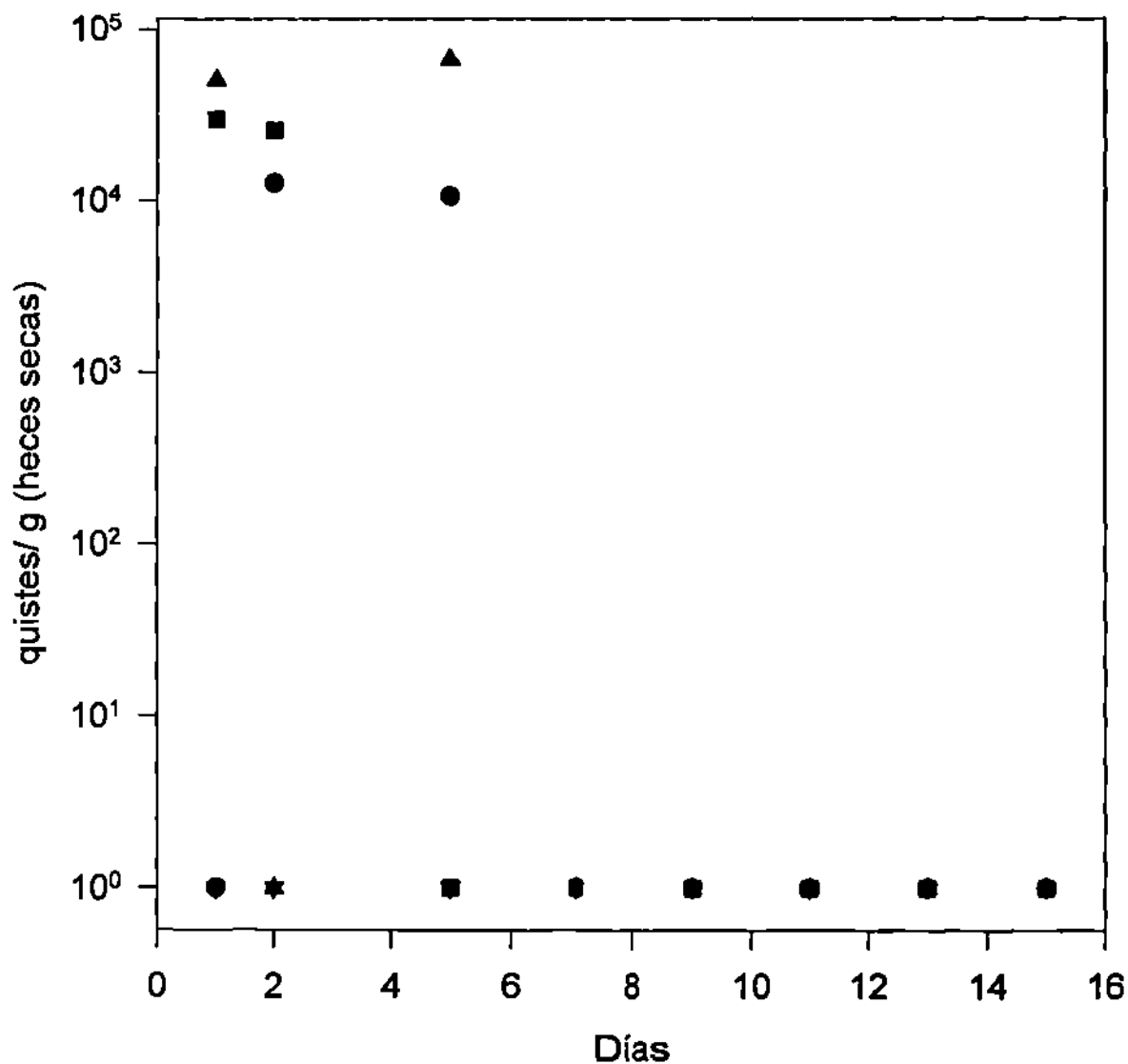


Figura 14. Efecto de la intoxicación con As sobre la giardiosis secundaria. Al término de la infección primaria por tratamiento con metronidazol, los ratones que se mantuvieron con agua de beber conteniendo NaAsO₂, se reinfestaron con quistes de *G. muris*. El monitoreo de la excreción de quistes se realizó de la manera habitual, mediante aislamiento en sacarosa, cuantificación con hematocitómetro y determinación de viabilidad mediante microscopía de fluorescencia. ●=Control, ■=50 µg/mL, ▲=125 µg/mL, ▼=250 µg/mL. Los valores representan los promedios ± desviación estándar.

3.3 DETERMINACION DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN *in vitro* DE *G. lamblia* A NaAsO₂.

Para la determinación del efecto de la exposición directa de los trofozoítos de *Giardia* a NaAsO₂, seleccionamos cultivos de *G. lamblia*, ya que no existen en la actualidad un método adecuado para el cultivo *in vitro* de *G. muris*, ni cepas caracterizadas del mismo.

3.3.1 Patrón de crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* cepas P1 y WB.

Se utilizaron dos cepas de referencia de *G. lamblia*, la cepa Portland 1 y la WB. La primera alberga en su interior un virus genoma de RNA de doble cadena, cuya presencia parece asociarse con una disminución en la capacidad de adhesión y en la velocidad de crecimiento. Sin embargo, ésta no se ha asociado a la capacidad de *G. lamblia* para llevar a cabo variación antigénica (Adam RD. 2001). Estas cepas fueron inicialmente aisladas a partir de muestras de pacientes que presentaban infección giardiósica sintomática. Independientemente de la presencia del profago, ambas cepas se clasifican dentro del Assemblage A, clasificación basada en la detección de polimorfismos en los genes que codifican para proteínas antigénicas variables de superficie (VASP's) y de la enzima glutamato deshidrogenasa (Ey P., 1993).

Se realizaron cultivos en medio TYI-S-33 completo, utilizando un inóculo inicial de 3.3×10^4 trofozoítos/mL. El inicio de la fase logarítmica fue observada a las 24 hrs, alcanzándose la densidad celular máxima a las 72 hrs, a partir de este punto la concentración celular permaneció constante hasta las 168 hrs, correspondiendo a la

fase de meseta de la curva de crecimiento de *G. lamblia*. Las características descritas para el patrón de crecimiento de diferentes cultivos de la cepa P1 de *Giardia* fueron idénticas a las obtenidas para los cultivos de la cepa WB (Figura 15).

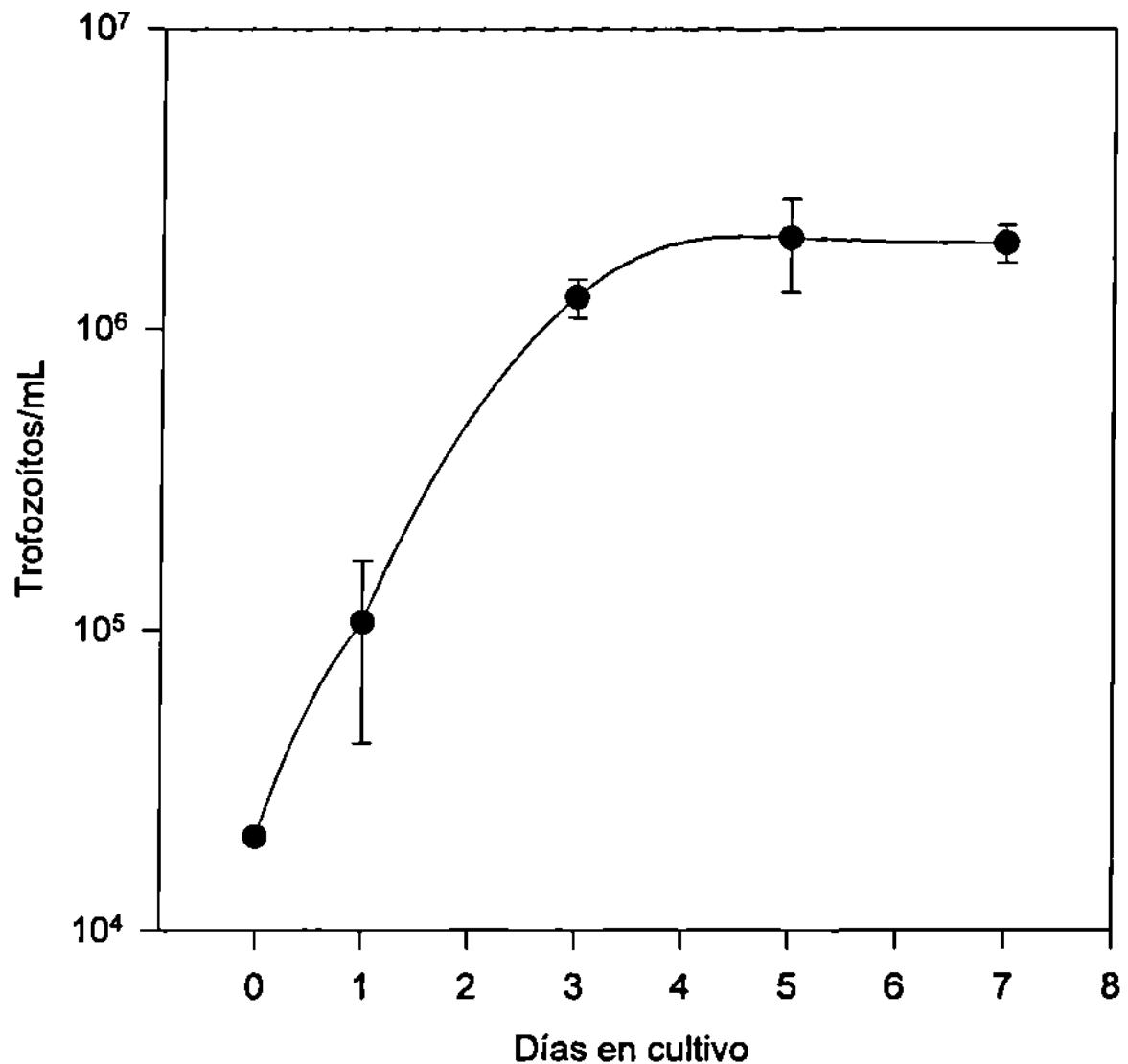


Figura 15. Patrón de crecimiento de la cepa P1 de *G. lamblia*. Trofozoítos de *G. lamblia* se cultivaron en medio TYI-S-33 completo; alícuotas de los cultivos se obtuvieron a los 0, 1, 3, 5 y 7 días. Se realizó la cuantificación de los trofozoítos en hematocítmetro y la determinación de la viabilidad mediante microscopía de fluorescencia. El inicio de la fase Log se observó a las 24 hrs alcanzándose una concentración celular máxima a las 72 hrs., la cual se mantuvo constante hasta las 168 hrs. Los valores representan los promedios \pm desviación estándar. Resultados estadísticamente similares se obtuvieron en varios experimentos independientes para las cepas WB y P1 de *G. lamblia*.

3.3.2 Validación del método para medir viabilidad en los trofozoítos de *G. lamblia*.

Con el fin de validar el método basado en el uso de FAD y EBr para la determinación de la viabilidad de trofozoítos de *G. lamblia*, se determinó el porcentaje de células vivas y muertas en suspensiones de trofozoítos de la cepa P1 mantenidos en cultivo en medio TYI-S-33 completo durante 5, 10 ó 14 días. Utilizamos cultivos de estas edades, ya que cultivos de trofozoítos de 3 días o menos, mostraron en todas las ocasiones un porcentaje de viabilidad igual a 100%, mientras que cultivos mayores de 5 días de duración muestran una disminución paulatina en la viabilidad de los trofozoítos.

Nuestros resultados mostraron una correlación inversa entre trofozoítos viables y no viables de una manera dependiente del tiempo en que permanecieron los trofozoítos en cultivo (Figura 16).

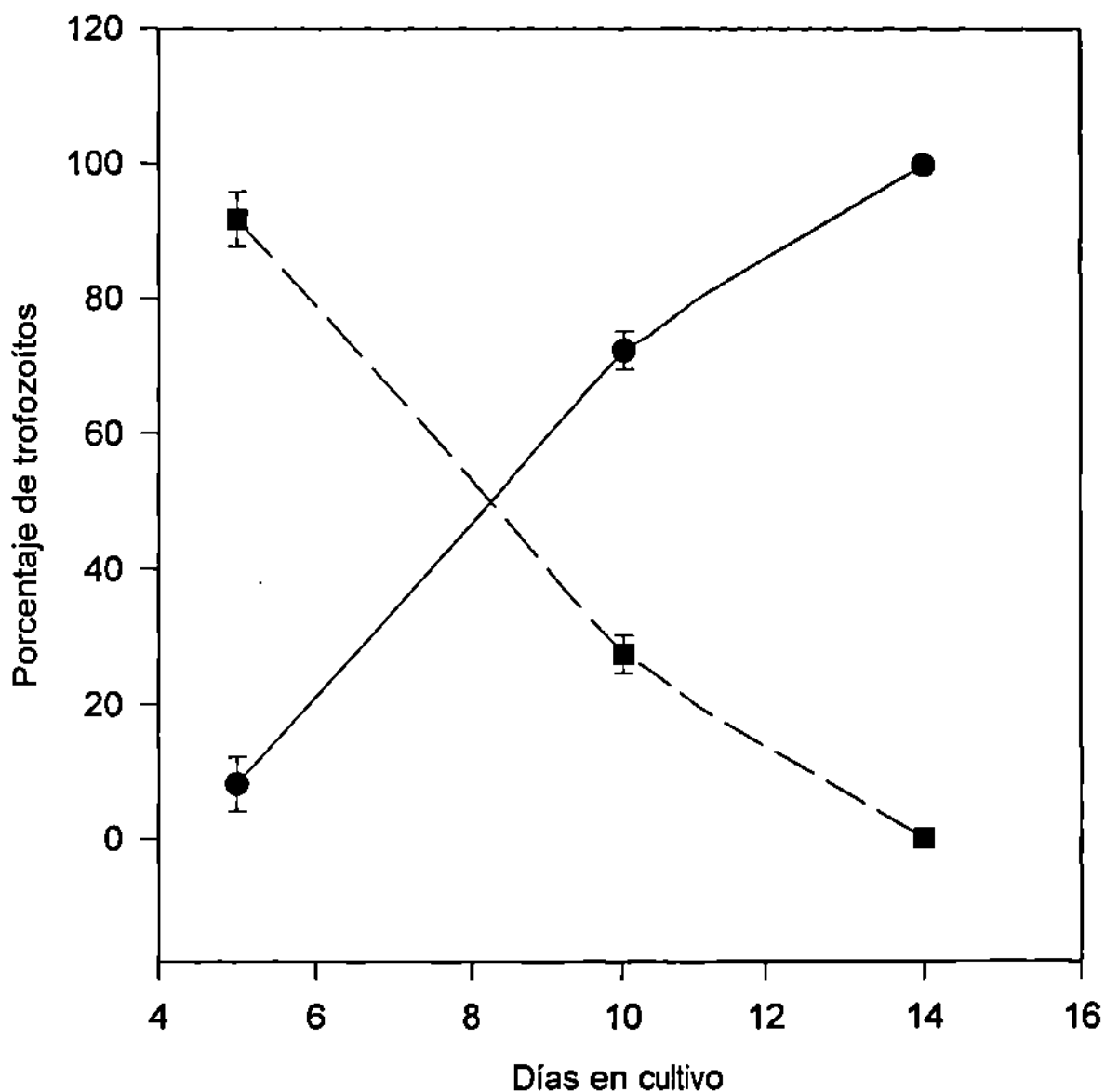


Figura 16. Validación del método para la determinación de viabilidad de trofozoítos de *G. lamblia*. Se determinó el porcentaje de células vivas y muertas en diferentes días de cultivo en medio TYI-S-33 mediante microscopía de fluorescencia utilizando FAD y EBr. ● = Muertos, ■ = Vivos. Los valores representan los promedios \pm desviación estándar. Resultados estadísticamente similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

3.3.3 Efecto del As sobre el patrón de crecimiento de *G. lamblia*.

Con el fin de determinar si la exposición a compuestos de As ocasiona cambios en las características de crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia*, se estudiaron los efectos de diversas concentraciones de sales de este elemento sobre su patrón de crecimiento *in vitro*. EL rango de concentraciones probadas de NaAsO₂ fue 10-1000 µg/L.

Comparado con cultivos en ausencia de los tóxicos, no se observaron efectos en la velocidad de crecimiento, densidad celular o viabilidad en los trofozoítos de *G. lamblia* de las cepas P1 y WB mantenidos hasta siete días en presencia de 10 a 200 µg/L de NaAsO₂ (Figura 17).

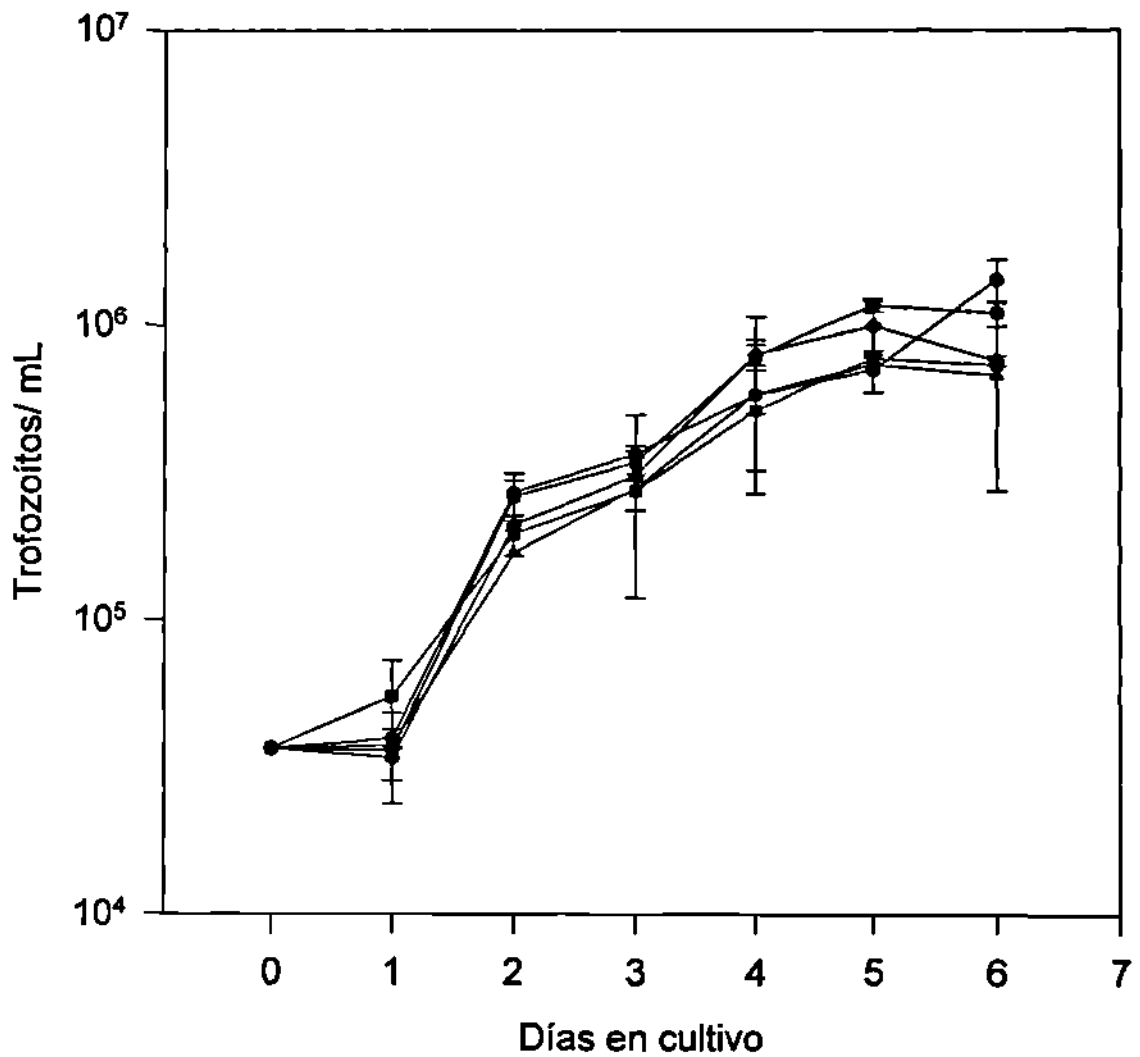


Figura 17 . Patrón de crecimiento de *G. lamblia* en presencia de 10-200 µg/L de NaAsO₂ en el medio de cultivo TYI-S-33. Los valores representan los promedios ± desviación estándar. Resultados estadísticamente iguales fueron obtenidos en tres experimentos independientes realizados para las cepas P1 y WB de *G. lamblia*. ●=0 µg/L, ■=10 µg/L, ▲=50 µg/L, ▼= 100 µg/L, ◆ 200 µg/L.

Sólo aquellos cultivos llevados a cabo con concentraciones superiores a 300 $\mu\text{g/L}$ de NaAsO_2 mostraron una inhibición en la velocidad de crecimiento y reducción en la densidad de trofozoítos de las cepas P1 y WB de *G. lamblia* después de 3 o 5 días en cultivo. En particular 750 y 1000 $\mu\text{g/L}$ causaron una marcada inhibición en el crecimiento y en la densidad de los trofozoítos de ambas cepas después de 3 y 5 días de cultivo (Figura 18). A pesar de los efectos tóxicos causadas por concentraciones superiores a los 300 $\mu\text{g/L}$ de NaAsO_2 la viabilidad de los trofozoítos recuperados de cultivos de 3 días fue en general mayor del 95%.

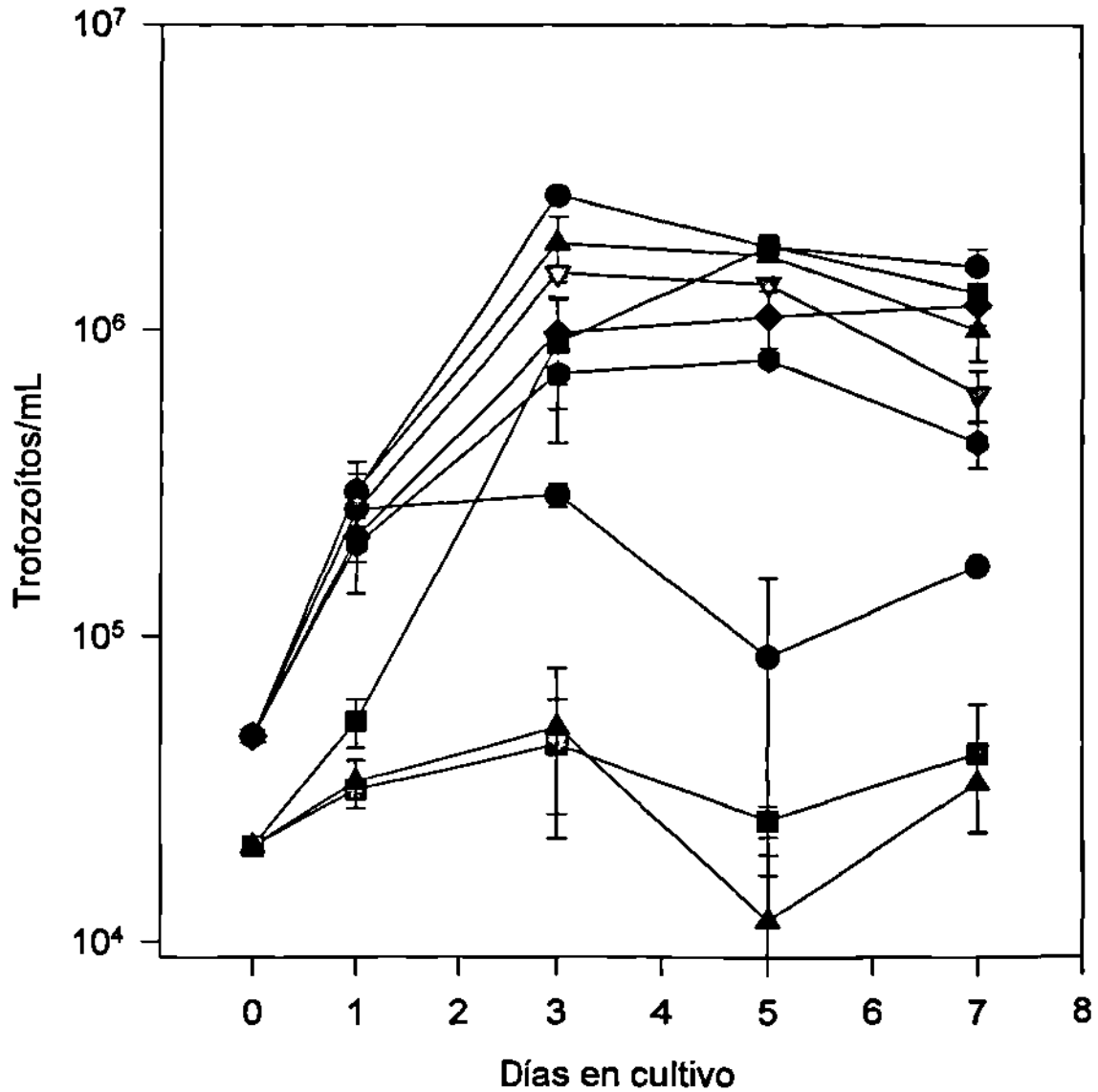


Fig. 18. Patrón de crecimiento de *G. lamblia* en presencia de 250-1000 µg/L de NaAsO₂ en medio de cultivo TYI-S-33. Resultados estadísticamente similares fueron determinados para las cepas P1 y WB en tres experimentos independientes. Los valores representan los promedios ± desviación estándar. ●=0 µg/L, ■=250 µg/L, ▼ 300 µg/L, ▽ =400 µg/L, ● =500 µg/L, ◆= 600 µg/mL, ● = 700 µg/L, ■ = 750 µg/L, ▲ 1000 µg/L

Graficando los datos del día tres de crecimiento en presencia de las diferentes concentraciones de As, el efecto de este tóxico sobre el crecimiento y la viabilidad de la cepa P1 de *G. lamblia*, muestra una clara dependencia de la dosis, con un 50% de inhibición del crecimiento causado por 409 $\mu\text{g/L}$ de NaAsO_2 (Figura 19).

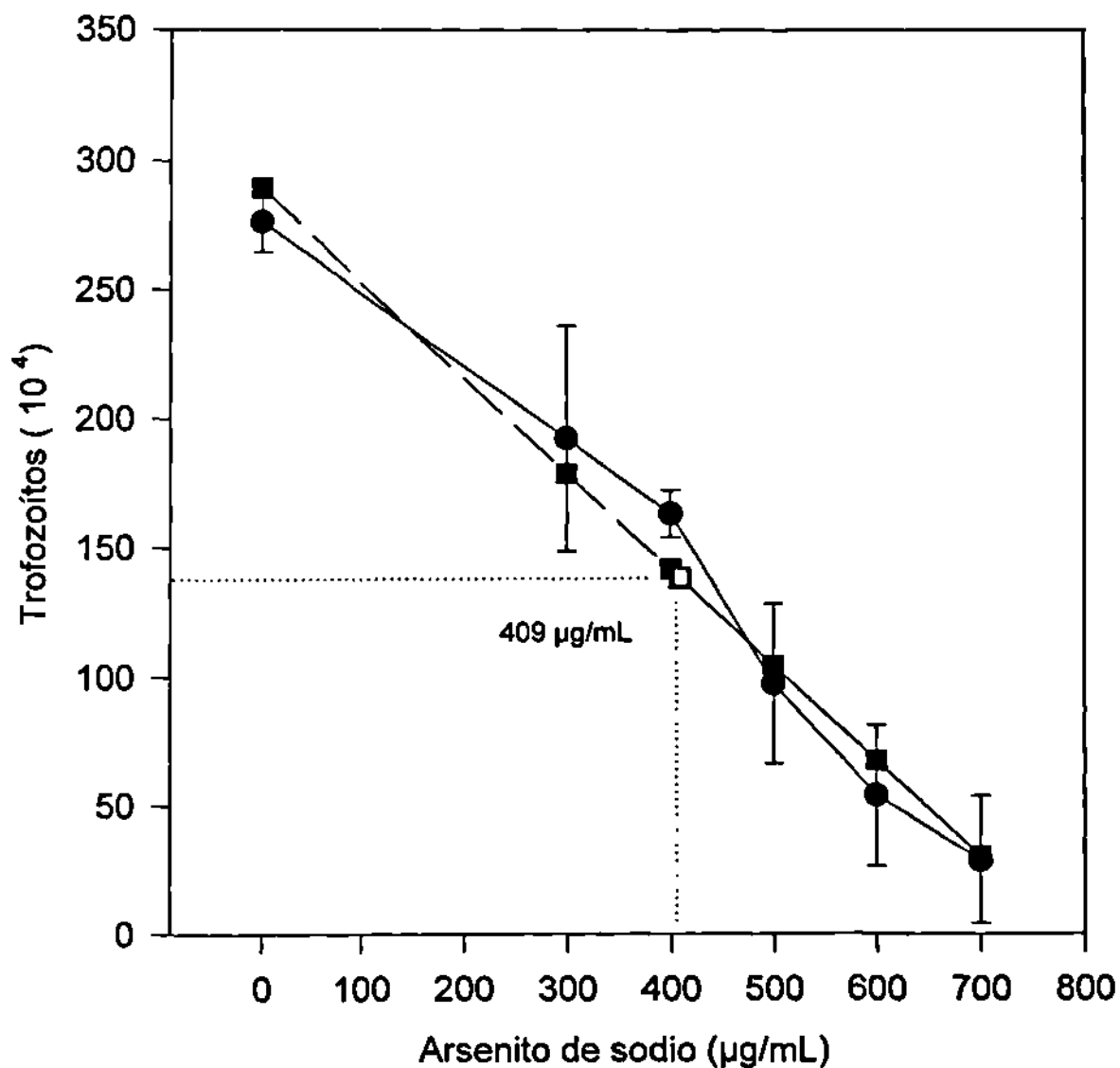


Figura 19. Curva dosis-respuesta del efecto del NaAsNO₂ sobre el crecimiento *In vitro* de *G. lamblia*. Se graficó el número de trofozoítos de la cepa P1 recuperados de cultivos de tres días de edad en función de las concentraciones de NaAsO₂ presentes en los mismos (●). La DI₅₀ = 409 µg/mL se obtuvo por interpolación en la ecuación obtenida por regresión lineal (línea punteada, ■) (Trofozoítos/mL = 289 × 10⁴ - 3703 × [As]; r = 0.9878).

3.3.4 Efecto del As sobre las fases metabólicas de crecimiento de *G. lamblia*.

Debido a que los efectos deletéreos del NaAsO₂ fueron en todos los casos mayores en los cultivos de cinco días de incubación que los observados en los cultivos de tres días de incubación, se analizó si este efecto dependía del tiempo de exposición de los cultivos al tóxico o de la edad de los mismos. Trofozoítos en etapa logarítmica, es decir, cultivados por dos días en medio libre de tóxicos, se transfirieron a medio conteniendo 200, 400 y 600 µg/L de NaAsO₂ y cultivados por 2 días adicionales.

Los resultados mostraron sólo efectos muy limitados sobre la densidad o la viabilidad de los trofozoítos en esta etapa de crecimiento. En contraste, cultivos de 5 días de edad de la cepa P1 o WB expuestos por dos días adicionales a medio conteniendo iguales concentraciones del tóxico, mostraron fuertes efectos negativos sobre la viabilidad celular (Figura 20).

Estos resultados nos indican que el efecto deletéreo del NaAsO₂ es mayor en los trofozoítos que se encuentran en reposo o quiescentes, que en los trofozoítos metabólicamente activos y en proliferación. Esto sugiere la presencia de un sistema de protección en contra del efecto de As en los trofozoítos que proliferan activamente, pero no en aquellos que se encuentran en reposo.

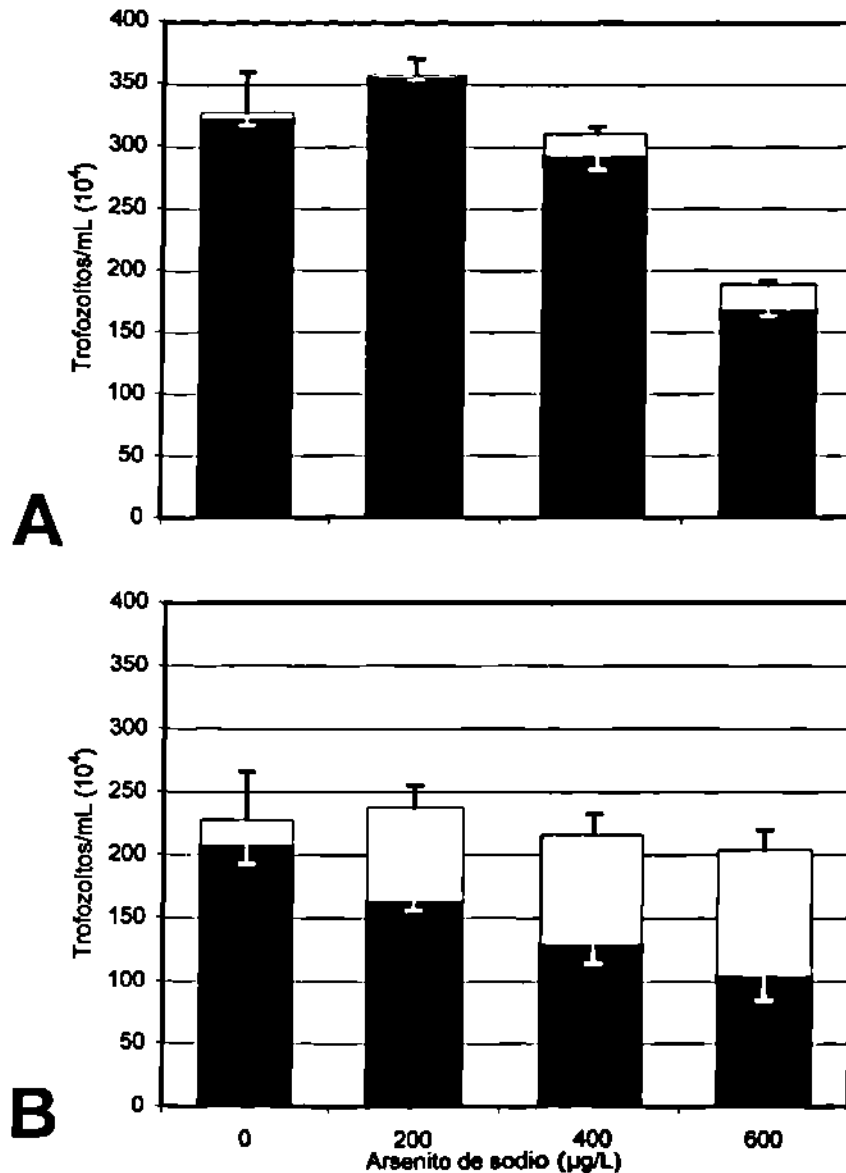


Figura 20. Efecto de la exposición *in vitro* a NaAsO₂ sobre la fase logarítmica de crecimiento y fase estacionaria de la cepa P1 de *G. lamblia*. Cultivos de trofozoítos de 2 (A) ó 5 (B) días de crecimiento en medio TYI-S-33 libre de tóxicos se cultivaron por dos días adicionales en presencia de 200, 400 ó 600 µg/L de NaAsO₂. Se determinó número de trofozoítos mediante cuantificación con hematocitómetro y su viabilidad mediante microscopía de fluorescencia. ■ Viabiles, □ Totales. Los valores representan promedios ± desviación estándar. Resultados estadísticamente similares fueron obtenidos en dos experimentos independientes.

3.3.5 Efecto de la exposición crónica con As sobre el crecimiento de *G. lamblia*.

Se analizó si el efecto inhibitorio en el crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* por la exposición de NaAsO₂ era reversible. Los trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa P1 fueron sujetos a ciclos consecutivos de cultivo en medio TYI-S-33 libre de tóxicos, seguido por cultivo en medio conteniendo 600 µg/L de As.

Al igual que lo observado en experimentos posteriores, la exposición a 600 µg/L del tóxico causó una disminución en la velocidad de crecimiento de los trofozoítos. Sin embargo, cuando el medio conteniendo el NaAsO₂ se reemplazó por medio libre de tóxico, los cultivos recobraron en un plazo de dos semanas la velocidad normal de crecimiento observado en cultivos libres de tóxico. Efectos similares fueron obtenidos en varios ciclos de exposición a NaAsO₂ (Figura 21).

Estos resultados nos indicaron que la inhibición del crecimiento causada por el NaAsO₂ es reversible, sin efecto aparente sobre la viabilidad de los trofozoítos de *G. lamblia*.

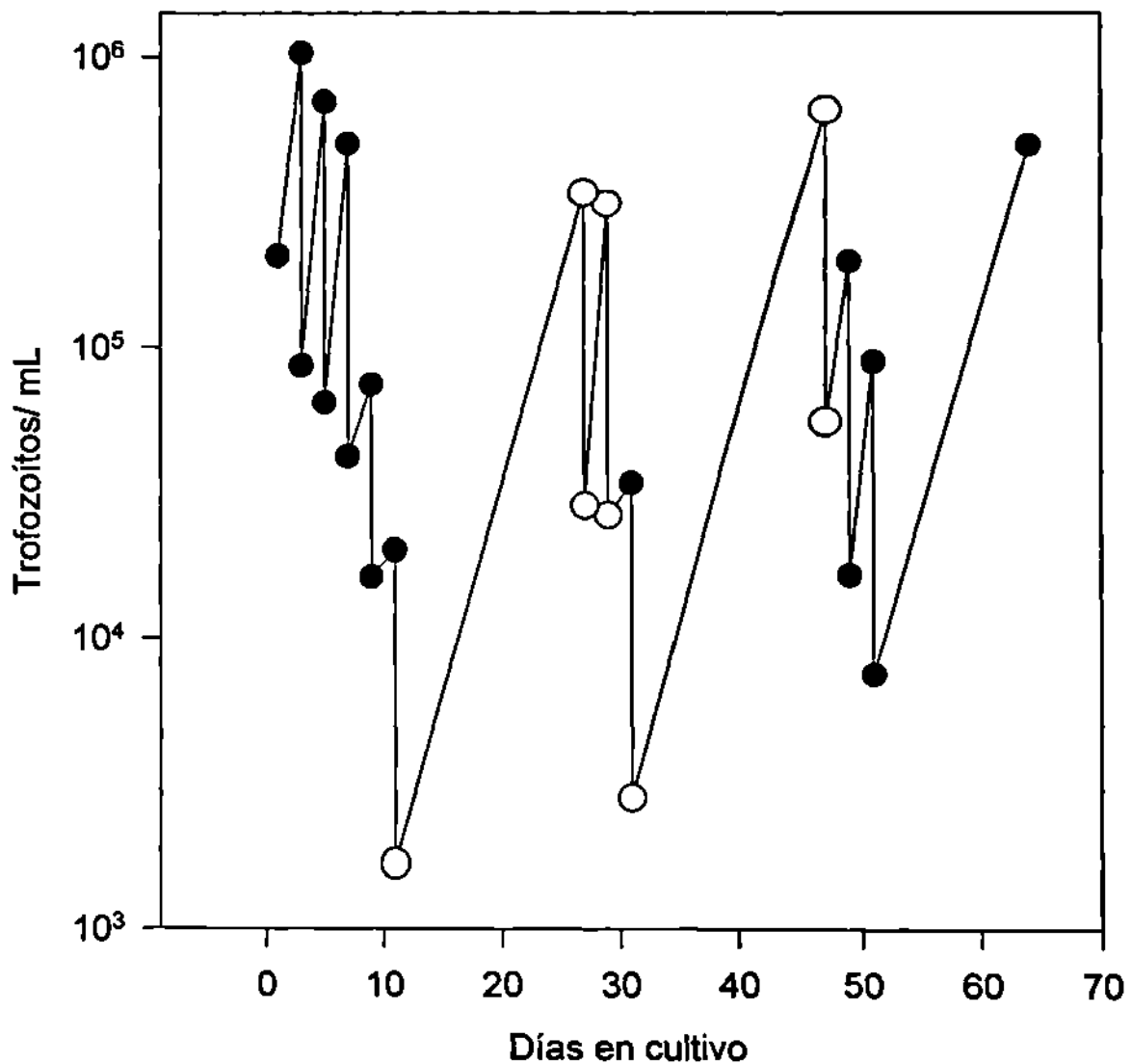


Figura 21. Reversibilidad del efecto inhibitorio del NaAsO₂ sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Trofozoítos de la cepa P1 de *G. lamblia* se cultivaron por ciclos consecutivos en presencia (●), o ausencia (○) de 600 µg/L de NaAsO₂, en medio TYI-S-33. El número y viabilidad de los trofozoítos se determinó por conteo directo en hematocitómetro y microscopía de fluorescencia antes de realizar los subcultivos correspondientes. Resultados estadísticamente similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

CAPITULO

4

DISCUSIÓN

Los estudios realizados con el fin de evaluar las propiedades inmunotóxicas del As han llevado a conclusiones muy variables las cuales sugieren un carácter tanto inmunotóxico como inmunopotenciador de este metaloide. Estos resultados aparentemente contradictorios, parecen ser el resultado del uso de diferentes sistemas experimentales, de la exposición a diferentes dosis y vías de administración, así como de la evaluación de diferentes parámetros inmunes en cada caso. En el presente trabajo se realizó la evaluación integral del efecto de la intoxicación oral crónica con As en ratones de la cepa BALB/c sobre diferentes mecanismos de protección inmune y sobre la capacidad de eliminación de la infección gastrointestinal causada por *G. muris*.

4.1 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON As SOBRE LOS MECANISMOS INMUNITARIOS.

En este trabajo nuestros resultados muestran que la ingestión oral crónica de NaNO_2 por ratones BALB/C causa alteraciones en algunas funciones del sistema inmune. Dependiendo de la concentración de NaAsO_2 ingerida por los ratones y el parámetro o función inmune analizada, los efectos sobre los diferentes mecanismos inmunitarios fueron estimulatorios, depresores o bien no se observó efecto alguno. La ingestión de agua conteniendo $50 \mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 , en general causó pocos efectos sobre los parámetros analizados. En contraste, la ingestión de agua conteniendo $125 \mu\text{g/mL}$ del tóxico causó alteraciones en la histología esplénica, así como disminución en la producción de anticuerpos IgG específicos inducidos por inmunización con ovoalbúmina. Sin embargo, esta última concentración de NaAsO_2 también indujo un incremento en la capacidad de los esplenocitos para la transformación de MTS estimulados por PWM y un incremento en la producción de NO por macrófagos peritoneales estimulados con LPS. La ingestión de agua conteniendo $250 \mu\text{g/mL}$ de NaAsO_2 , causó efectos deletéreos en la producción de NO por macrófagos peritoneales e inmunoglobulina IgG específica contra ovoalbúmina. Esta concentración del tóxico causó adicionalmente un efecto negativo sobre el peso corporal y su relación con el peso del bazo, indicando que los efectos de la dosis del tóxico puede tener un componente de toxicidad sistémica y, por lo tanto, no puede considerarse puramente inmunológico. Las diferencias en los efectos producidos por el NaAsO_2 sobre los diferentes parámetros inmunes en ratones BALB/c intoxicados, nos sugieren que los

efectos dependientes de la concentración del tóxico, del tipo de células, de la función que desempeñan y muy probablemente del tejido u órgano al que pertenecen.

Efectos estimulatorios similares a los causados por la ingestión de agua conteniendo 125 µg/mL de NaAsO₂ sobre la proliferación de las CMN y la producción de NO por macrófagos peritoneales inducidos por estimulación inespecífica, han sido previamente reportados en otros modelos experimentales. Por ejemplo, se ha reportado que la instilación intratraqueal de 50–200 mg/kg de arsenuro de galio (GaAs) en ratones, produce un incremento en la resistencia a las infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae* y *Listeria monocytogenes* (Burns y col., 1993) así como a un aumento en los niveles séricos del componente C3 del complemento (Sikorski y col., 1989). Así mismo la exposición de ratones a 2.5, 25 y 100 µg/L de NaAsO₃ en el agua para beber durante 10-12 semanas, aumentó la resistencia al desarrollo de tumores inducidos por células MSB de sarcoma (Kerkevliet y col., 1980). La evaluación del efecto de la exposición crónica a As en humanos sobre los mecanismos inmunes, si bien ha mostrado la disminución en ciertos parámetros como la producción espontánea de IFN-gamma o inducida por PHA, también ha mostrado el incremento en otros, como la incorporación de H³-Timidina inducida por PHA en CMN y liberación espontánea de IL-2 y de las moléculas sCD4 y sCD8 (Yu y col., 1998). Estas observaciones, en conjunto con las obtenidas en el presente trabajo, nos indican que el carácter de los efectos causados por exposición a As puede describirse como inhibitorio, estimulatorio o nulo, y nos sugieren que el efecto es independiente de la ruta, del tiempo de exposición ó del modelo de experimentación utilizado. El efecto más bien parece depender del grado de exposición y del parámetro inmune analizado. El efecto del As sobre el sistema inmune podría entonces definirse como efecto modulador. Esta capacidad modulatoria sobre

el sistema inmune por parte del As en individuos expuestos, podría traducirse y reflejarse en alteraciones de las características de una enfermedad infecciosa y por lo tanto en la competencia del hospedero para la eliminación de microorganismos patógenos.

4.2 EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON As SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA GIARDIOSIS MURINA.

El estudio de la competitividad de un huésped para resistir o eliminar una enfermedad infecciosa, es un parámetro importante que nos permite evaluar el estado inmune general de un individuo tras la exposición a tóxicos ambientales. En el presente trabajo utilizamos el modelo murino de giardiosis para evaluar el efecto de la intoxicación oral crónica con diferentes concentraciones de arsenito de sodio sobre las características de la infección y la capacidad de eliminación de la misma. Encontramos que la ingestión crónica de agua conteniendo con 50 µg/mL de NaAsO₂ por ratones BALB/c, no produce consecuencias significativas en las características de la giardiosis murina en términos del número de quistes excretados y la duración de la infección, comparada con ratones no intoxicados. Sin embargo, la ingestión de agua conteniendo 125 y 250 µg/mL del tóxico indujo cambios notorios en las características de la infección que consistieron en mayor variabilidad en el patrón de eliminación de quistes de *G. muris* y la desaparición precoz de la misma, comparado con ratones que no ingirieron el tóxico. Es de notarse el hecho de que en ningún caso observamos un incremento significativo en la cantidad de quistes o duración de la excreción de los mismos, que sugiriera un efecto

inmunosupresor o permisivo del As en los ratones que ingirieron crónicamente agua con diferentes concentraciones de NaAsO₂. Por el contrario, la intoxicación con 125 y 250 µg/mL de NaAsO₂ dio lugar a la eliminación prematura de la infección. Estos resultados sugieren que, al menos en lo que se refiere a los mecanismos inmunitarios involucrados en la eliminación de la infección giardiósica a nivel intestinal, la intoxicación de ratones con NaAsO₂ no parece causar efectos deletéreos que se reflejen en un aumento en la gravedad o en la capacidad de eliminación de la infección causada por *G. muris*.

En nuestro trabajo, el modelo de infección con *G. muris* nos permitió detectar los efectos de fármacos reconocidos como inmunotóxicos sobre las características de la giardiosis. El tratamiento de ratones BALB/c con dexametasona, incrementó notablemente la cantidad de quistes excretados y duración de la excreción de quistes de *G. muris* con respecto a ratones que no fueron sometidos al régimen inmunosupresión con dexametasona. Estudios previos han reportado el incremento en el número de trofozoítos encontrados en el yeyuno de ratones tratados con dexametasona con respecto a ratones no tratados (Ducombe y col., 1980), así como el desarrollo de infecciones giardiósicas persistentes.

Por otro lado, el modelo de infección con *G. muris* también permitió observar el efecto de condiciones de inmunodeficiencia sobre las características de la giardiosis murina. Ratones de la cepa CBA/CaHN (X^{hd}) que muestra una inmunodeficiencia caracterizada por bajos niveles de IgG₃, baja producción de anticuerpos específicos contra el hapteno fosfocolina y una ausencia casi total de una subpoblación de linfocitos B Ly1⁺, desarrolló una infección crónica con este protozoario, tal y como ha sido descrito anteriormente (Khanna y col., 1990). Estos resultados están de acuerdo con resultados

de otros grupos que muestran que las inmunodeficiencias tanto hereditarias como las causadas por agentes inmunosupresores, inducen consistentemente al desarrollo de infecciones giardiósicas crónicas (Fathing 1985; Balazs y col., 1978). Así mismo, estos resultados apoyan nuestra propuesta de que, bajo las condiciones probadas en el presente trabajo, la intoxicación oral crónica de ratones de la cepa BALB/c con NaAsO₂ no parece inducir efectos inmunosupresores que resulten en mayor gravedad o en mayor duración de infecciones por *G. muris*. El tratamiento de los ratones con 125 y 250 µg/mL de NaAsO₂ indujo alteraciones en diferentes mecanismos inmunitarios, los que en conjunto podrían haberse reflejado en la eliminación prematura de la infección por los ratones.

El NO es una de las biomoléculas más pequeñas producida por activación de los macrófagos con funciones mediadoras de la respuesta inmune (Fang y col., 1997). Existen evidencias de que compuestos derivados del NO, participan en la inhibición del crecimiento y diferenciación de *G. lamblia*, tanto hacia la fase quística como trofozoítica (Eckmann y col., 2000; Fernández y col., 1997). Ya que se ha reportado que las células epiteliales del intestino delgado también tienen la capacidad de producir NO, este efecto del NO ha sido considerado como un mecanismo adicional de defensa del huésped hacia las infecciones intestinales por el protozoario *G. lamblia* y que es llevado a cabo por las mismas células epiteliales (Eckman y col., 2000). El aumento en la producción de NO por los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones que ingirieron agua conteniendo 125µg/mL de NaAsO₂, así como por otras células presentes en el lumen intestinal podría explicar, al menos en parte, la eliminación prematura de la infección en estos ratones, además de la gran variabilidad observada en la excreción de quistes. Sin embargo, parece improbable que esta misma explicación sea válida en

la exposición crónica a 250 µg/mL de NaAsO₂ sobre la infección por *G. muris*, ya que, aunque la intoxicación de los ratones con esta concentración del tóxico causó un aumento significativo en la capacidad de las CMN estimuladas con PWM para transformar el MTS, también indujo una inhibición en la producción de NO por los macrófagos peritoneales. Como se mencionó anteriormente, es posible entonces que otros mecanismos inmunes así como factores fisiológicos y químicos que no fueron evaluados en este trabajo se vieran modificados con esta concentración del tóxico y que, en conjunto, favorecieran la eliminación de la infección. Por ejemplo, las cryptdinas, ó defensinas (Aley y col., 1994), la lactoferrina (Turchany y col., 1995) y otros péptidos pequeños con actividad antimicrobiana sintetizados en el intestino delgado, están involucrados en la eliminación de la giardiosis y podrían haber participado en la eliminación prematura de la giardiosis observada en los ratones que ingirieron 125 y 250 del tóxico.

4.3 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE *G. lamblia* A NaAsO₂ *in vitro*.

Con el fin de evaluar la posibilidad de que la eliminación prematura de las infecciones causadas por *G. muris* pudieran ser debidas a un efecto directo del tóxico sobre trofozoítos presentes en el intestino de los ratones intoxicados con 125 y 250 µg/mL de NaAsO₂, se analizó el efecto de la exposición a As sobre la sobrevivida y crecimiento de *G. lamblia* en cultivos *in vitro*.

4.3.1 Efecto de la exposición a As sobre el crecimiento de *G. lamblia*.

En el presente trabajo encontramos que el patrón de crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* de las cepas analizadas (WB y P1), no es afectado de manera significativa por la exposición del parásito a concentraciones de hasta 300 µg/L de NaAsO₂ *in vitro*, sin embargo, las concentraciones superiores a 300 µg/L presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los trofozoítos. La magnitud de dicho efecto inhibitorio dependió directamente de la concentración de tóxico presente en el medio de crecimiento de *G. lamblia*. La concentración de 300 µg/L de NaAsO₂ utilizada en el presente trabajo y a la cual no se observa un efecto negativo sobre el crecimiento del parásito, ha mostrado ser causa de efectos deletéreos sobre otras células eucarióticas, incluyendo de humanos (Raytapadar y col., 1995). Por ello, nuestros resultados sugieren que *G. lamblia* posee o es capaz de desarrollar mecanismos de resistencia hacia los efectos tóxicos del NaAsO₂, mismos que le permiten sobrevivir y multiplicarse sin alteración aparente de su metabolismo y estructura.

Es importante hacer notar que las concentraciones de NaAsO₂ a las cuales *G. lamblia* es capaz de crecer *in vitro* sin modificar su patrón de crecimiento, son 4 hasta 23 veces mayores a las calculadas como presentes en el intestino de los ratones que ingirieron agua conteniendo 50, 125 o 250 µg/mL del tóxico, respectivamente. Por lo tanto, es poco probable que el NaAsO₂ presente en el intestino de los ratones tuviera un efecto tóxico directo sobre los trofozoítos de *G. muris* que pudiera explicar la eliminación prematura de la infección.

Cabe la posibilidad de que nuestros cálculos subestimen la concentración de arsenito de sodio presente en el intestino de los ratones intoxicados. El método espectrofotométrico

utilizado para la medición de la concentración de As en los tejidos fue validado mediante el uso de estándares certificados por el National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, NIST), por lo que un error en este aspecto es poco probable. Por otro lado utilizamos un método empírico para la transformación de unidades de ng de As/ gr de tejido en $\mu\text{g/L}$ de tejido, en el que estimamos que podría existir un máximo de error del 50%. De esta manera, aún considerando que la concentración de NaAsO_2 presente en la luz del intestino de los ratones intoxicados supera en el doble a la calculada por nosotros, estas concentraciones continúan siendo menores que las concentraciones máximas en las cuales *G. lamblia* fue capaz de crecer *in vitro* ($300 \mu\text{g/L}$) sin cambios en sus características de crecimiento.

4.3.2 Mecanismos de resistencia microbiana a tóxicos ambientales.

No ha sido documentada la existencia de mecanismos de resistencia o protección que puedan explicar la aparente capacidad de *G. lamblia* para resistir la presencia de altas concentraciones de As que observamos en este trabajo. La participación de tior-proteínas o péptidos pueden ser propuestos como posibles mecanismos involucrados en la resistencia de los trofozoítos de *G. lamblia* hacia los efectos tóxicos del NaAsO_2 .

Diversos microorganismos tales como bacterias y algunos parásitos expresan mecanismos de resistencia contra los efectos tóxicos de metales, iones o productos biológicos presentes en el medio ambiente en donde se desarrollan (Silver y col., 1996). Genes localizados en cromosomas, plásmidos o bien en transposones, codifican resistencia específica en contra de una variedad de iones metálicos como Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , AsO_2^- . Se han descrito al menos seis mecanismos de resistencia a metales en microorganismos: exclusión por barrera permeable, secuestación intracelular o extracelular, bombas de eflujo por transporte activo, detoxificación enzimática y reducción en la sensibilidad de moléculas blanco celulares a los iones metálicos (Bruins y col., 2000).

El grupo más grande dentro de los sistemas de resistencia a metales en microorganismos lo constituye las bombas de eflujo de iones tóxicos dependientes de energía. Estas bombas, expresadas por diversas bacterias grampositivas y gramnegativas, excluyen los tóxicos hacia el medio extracelular, manteniendo así concentraciones intracelulares del tóxico tan bajas que resultan inofensivas. Algunas de las bombas de eflujo son ATPasas y sistemas antiporters quimiosmóticos catión/protón. Por ejemplo, los sistemas de eflujo para la detoxificación de arsénico en

las bacterias gramnegativas, utilizan alternativamente una ATPasa de dos componentes codificados respectivamente por los genes *ArsA* y *ArsB*, o bien un solo polipéptido derivado del gen *ArsB* que funciona como un transportador quimiosmótico. En este sistema de resistencia al arsénico un tercer gen, *ArsC*, codifica para una enzima encargada de transformar el arsenato intracelular [As (V)] a arsenito [As (III)] , mismo que constituye el sustrato para el sistema de eflujo. (Silver S. 1996). En las bacterias grampositivas la resistencia a As se debe a la presencia de la proteínas *ArsB* y *ArsC*, pero no existe una ATPasa (Carlin y col., 1995). Aunque la mayoría de los sistemas de eflujo conocidos son codificados por genes presentes en plásmidos bacterianos, también se conocen determinantes de resistencia a metales tóxicos codificados cromosómicamente (Diorio C y col., 1995). El análisis comparativo de ambos sistemas ha mostrado que los determinantes plasmídicos y cromosómicos de resistencia son básicamente los mismos.

La detoxificación enzimática consiste en que compuestos tóxicos derivados de As, Pb, Cd, Co, Ni y Cr presentes en el medio ambiente, son transformados por algunas especies de bacterias a compuestos con menor o nula toxicidad, generalmente mediante procesos de reducción y metilación (White y col., 1997). Estos compuestos son posteriormente eliminados por las células hacia el medio extracelular.

Otro mecanismo de resistencia hacia los efectos tóxicos de metales, descrito tanto en células eucarióticas como procarióticas involucra procesos de quelación de iones a través de tior-proteínas. Las moléculas que tienen mayor relevancia en este grupo son las metalotioneínas. Las metalotioneínas bacterianas unen, secuestran y controlan la concentración intracelular de zinc y otros metales (Robinson y col., 2001). En general estas moléculas son proteínas cuya característica más relevante es la de contener una

alta proporción de residuos de cisteína presentes en secuencias características CYS-X-X-CYS, CYS-X-CYS o CYS-X-Y-CYS (Kägi y col., 1987). Estas proteínas son capaces de formar enlaces coordinados con iones metálicos tales como Cu, Zn o Cd a través de los grupos tiol de sus residuos de cisteína (Kägi JHR. 1987; Turner y col., 1995a, Turner y col., 1995b). Como se discute abajo, la participación de tiol- proteínas o péptidos pueden ser propuestos como posibles mecanismos involucrados en la resistencia de los trofozoítos de *G. lamblia* hacia los efectos tóxicos del NaAsO₂.

4.3.3 Mecanismos de resistencia en *Giardia* .

En los trofozoítos de *G. lamblia* ha sido descrito un mecanismo de detoxificación de metabolitos del oxígeno a través de un sistema que involucra una NADH oxidasa (Upcroft P y col., 1998), así como de una NADH peroxidasa de superficie que protege a este microorganismo de radicales de peróxido presentes en el medio extracelular. Sin embargo, en este parásito no se ha descrito la existencia de sistemas transportadores o de mecanismos de inactivación metabólica.

Desde las bacterias hasta organismos eucarióticos pluricelulares como el hombre, todos los organismos poseen mecanismos de detoxificación de radicales tóxicos, entre los cuales el sistema glutatión (GSH) se considera el primer mecanismo de defensa. Sin embargo, en *G. lamblia* no ha sido posible demostrar la existencia de este mecanismo. En su lugar, grandes cantidades de cisteína y una thioredoxin reductasa semejante a la bacteriana son los encargados de mantener el balance redox intracelular (Fahey y col., 1991, Brown y col., 1993; Brown y col., 1996; Lujan y col., 1994). Los trofozoítos

de *G. lamblia* presentan en su membrana plasmática un tipo de proteínas predominantes con características antigénicas variables. Se ha propuesto que estas Proteínas Antigénicas Variables (VSAP's, Variable surface antigen proteins) también llamadas Proteínas ricas en Cisteína (CRP, cysteín rich protein) (Nash 1992), tienen un papel de guardianes en contra de factores presentes en el ambiente hostil del intestino, al cual está sujeto *Giardia*. Estas proteínas poseen varias características correspondientes a las metalotioneínas de tipo I, incluyendo alto contenido de residuos de Cys, secuencias Cys-XX-Cys y la capacidad de establecer enlaces coordinados con iones metálicos a través de sus grupos sulfhidrilos (Nash TE. 1993; Zhang y col., 1993). Estas características sugieren que las VSAP's pueden constituir proteínas membranales con una función de detoxificación equivalente a la desempeñada por metalotioneínas descritas en otras células eucarióticas, esto es, funcionando a través de la quelación de iones. Estos mecanismos podrían permitir la supervivencia y crecimiento de los trofozoítos del parásito bajo condiciones en las que los mecanismos de protección inmune del huésped se ven alterados o comprometidos, tal como durante la exposición a altas concentraciones de As, y en las cuales las VSAP's tendrían un importante papel realizando la quelación o secuestro de los iones de As presentes en el ambiente donde se desarrolla.

En el presente trabajo también encontramos evidencias de que el hipotético mecanismo de resistencia en contra de los efectos tóxicos del NaAsO_2 parece expresarse de acuerdo al estado metabólico de los trofozoítos de *G. lamblia*. El efecto negativo del As sobre el crecimiento y viabilidad observado sobre trofozoítos tomados a partir de cultivos en fase logarítmica (metabólicamente activos) fue muy limitado en comparación a lo observado en trofozoítos que fueron tomados de cultivos que se

encontraban en fase estacionaria. En condiciones naturales, los trofozoitos de *Giardia* que se encuentran adheridos a las microvellosidades del intestino delgado en huéspedes infectados, podrían encontrarse en un estado continuo de multiplicación debido al aporte constante de nutrientes a partir de la luz del intestino. Por esta razón, es posible asumir que, bajo las condiciones normales de crecimiento de *Giardia* en sus huéspedes naturales, el mecanismo putativo de resistencia en contra de As existente en este parásito, está siendo continuamente expresado.

CAPITULO

5

CONCLUSIONES

5.1 EFECTO DE LA INTOXICACION CRONICA ORAL CON As SOBRE LOS MECANISMOS DE DEFENSA Y LA GIARDIOSIS MURINA.

- La intoxicación crónica de ratones con la concentración de 250 µg/mL de NaAsO₂ parece también provocar efectos tóxicos sistémicos en conjunto con efectos inmunotóxicos putativos.
- La exposición oral de ratones a NaAsO₂ provoca cambios en las características de la infección giardiósica en ratones BALB/c quizá como un reflejo de alteraciones tanto inmunes como fisiológicas causadas por el tóxico. La ingestión de NaAsO₂ a concentraciones de 125 µg/mL y mayores, provoca alteraciones en el curso de la infección de ratones con *G. muris* (giardiosis murina), consistiendo ésta en una mayor variabilidad en la magnitud de la excreción de quistes, y en la eliminación prematura de la infección.

5.2 EFECTO DEL As SOBRE LAS CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO DE *G. lamblia*.

In vitro, concentraciones de hasta a 300 µg/mL de NaAsO₂ no alteran significativamente la velocidad de crecimiento o la viabilidad de los trofozoítos de *G. lamblia*. Concentraciones superiores causan una inhibición reversible dependiente de la dosis, en la velocidad de crecimiento de los trofozoítos, con efectos limitados sobre su viabilidad.

El efecto deletéreo del NaAsO₂ sobre el crecimiento y viabilidad de *G. lamblia*, depende del estado metabólico del parásito, siendo de mayor grado en los trofozoítos que se encuentran en un estado de reposo que en los trofozoítos metabólicamente activos.

5.3 PERSPECTIVAS DE TRABAJO.

Dadas las malas condiciones de vida de una gran parte de la población mexicana, en la que enfermedades infecciosas y contaminación ambiental son problemas de salud coexistentes, es importante que las interacciones existentes entre el medio ambiente, el huésped y los agentes infecciosos se estudien detalladamente. El presente trabajo constituyó un primer estudio de un programa tendiente a determinar los efectos que los contaminantes ambientales producen sobre los diferentes mecanismos de protección que participan en la eliminación de las enfermedades infecciosas. Otras enfermedades infecciosas que podrían considerarse como un futuro blanco de este tipo de estudios son la tuberculosis y la entamoebiosis, las cuales representan también un serio problema de salud pública en nuestro país.

En vista del carácter altamente mutagénico de varios de los compuestos tóxicos encontrados en diferentes ambientes donde se desarrollan el hombre y los microorganismos infecciosos, un aspecto que resulta imperativo analizar, es el efecto de la exposición a sustancias tóxicas mutagénicas sobre las características genéticas de los agentes infecciosos y su asociación con las características fenotípicas de virulencia y de patogenicidad. El análisis de estos aspectos no debe perderse de la vista de los microbiólogos y debe ser motivo de vigilancia constante en los centros de investigación.

CAPITULO

6

REFERENCIAS

1. Adams DO, Dean JH, (1982) Analysis of macrophage activation and biological response modifier effects by use of objective markers to characterize the stages of activation. In Herberman, R. (ed): Natural Cell Mediated Immunity. II. Academic Press. Inc. New York. 511-18.
2. Adam RD. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14: 447-75.
3. Adkins B, Richards JH, Gardner DE. (1979) Enhancement of experimental respiratory infections following nickel inhalation. Environ Res. 20:33-42.
4. Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME, Gillin FD. (1994) Killing of *Giardia lamblia* by criptidins and cationic neutrophil peptides. Infect. Immun. 62:5397-403.
5. Aubier M. (2000) Air Pollution and allergic asthma. Rev. Mal. Respir. 17 (1 Pt2): 159-65.

6. Baer RL, Ramsey DL, Bondi E. (1973). The most common contact allergens. Arch. Dermatol. 108:74-78.
7. Barbour AG, Nichols CR, Fukushima T. (1976). An outbreak of giardiasis in a group of campers. Am. Trop. Med. Hyg. 25:384-9.
8. Bekesi JG, Holland JF, Anderson HA, Fischbein AS, Rom W, Wolff MS, and Selikoff IJ. (1978). Lymphocyte function of Michigan dairy farmers exposed to polibrominated biphenyls. Science, 1999: 1207-1209.
9. Balazs M, Szaltock E. (1978). Electron microscopic examination of the mucosa of the small intestine in infection due to *Giardia lamblia*. Phatol. Res. Pract. . 163: 251-60.
10. Benin AL, Sargent JD, Dalton M, Roda S. (1999). High concentrations of heavy metals in neighborhoods near of smelters in northern Mexico. Environ. Health. Perspect. 107:279-84
11. Borella P, Giardino A. (1991). Lead and Cadmium at very low doses affect *in vitro* immune response of human lymphocytes. Environ. Res. 55:165-77.
12. Borst P, Ouellette M. (1995), New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. Annu. Rev. Microbiol. 49:427-60.

13. Brown DM, Upcroft JA and Upcroft P. (1993). Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 61: 155-158.
14. Brown DM, Upcroft JA, and Upcroft P. (1996). A thioredoxin reductase class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 83: 211-220.
15. Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. (2000). Microbial Resistance to metals in the environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45:198-207.
16. Burns LA, McCay JA, Brown R, and Munson AE. (1983). Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD25. J. Pharmacol. Exp. Ther. 265:795-800.
17. Burns LA., McCay R., Brown R., and Munson AE. (1993), Arsenic in the sera of Gallium arsenide-exposed mice inhibits bacterial growth and increases host resistance. J. Pharmacol. Exp. Ther. 256:795-800.
18. Callahan HL, Beverley SM, (1991) Heavy metal resistance: a new role P-glycoproteins in Leishmania. J. Biol. Chem. 266:18427-30.
19. Carlin A, Shi W, Dey S, Rosen BP. (1995) .The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. J. Bacteriol. 177:981-6.

20. Cervantes C, Ji G, Ramirez JL, Silver S. (1994) Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 355-67. 1-13.
21. Clark G, Coalson RE, Norquist RE. (1973) *Methods for General Tissue. En: Staining Procedures.* George Clark Editor. Tercera Edición. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 33-49.
22. Coffin DL, Gardner DE, (1972). Interaction of biological agents and chemical air pollutants. *Ann. Occup. Hyg.*, 15:219-35.
23. Cohen MD, Sisco M, Li Y, Selikoff JT, Schlesinger RB. (2001) Ozone-induced modulation of cell-mediated immune response in the lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 171: 71-84.
24. Dean JH, Padarathsingh ML, Jerrells TR, Keys L, Northing JW. (1979). Assesment of immunobiological effects induced by chemicals, drugs or food additives. II. Studies with cyclophosphamide. 1979. *Drug. Chem. Toxicol.* 2:133-53.
25. Dean JH, Luster MI, Boorman GA, Luebke RW, Lauer LD. (1982a). Application of tumor, bacterial and parasite susceptibility assays to study immune alterations induced by environmental chemicals. *Environ. Health. Perspect.* 43:81-88.

26. Dean JH, Luster MI, Boorman GA, Luebke RW, Lauer LD. (1982b). Procedures available to examine the immunotoxicity of chemicals and drugs. *Pharmacol. Rev.* 34: 137-48.
27. Dean JH, Luster MI, Boorman GA, Lauer LD, Luebke LD, Ward EC. (1983). Immunotoxicity of tumor promoting environmental chemicals and phorbol diesters. En: "Advances in Immunopharmacology 2". Pergamon Press, Oxford. Haden JW, et al (eds). 23-31.
28. Dean JH, Murria MJ, Ward EC. (1986). Toxic Responses of the Immune System. En: "Cassarett and Doull's Toxicology, the basic science of Poisons". Tercera Edición. Klassen CD., Amdur MO., Doull J. editors. 245-285.
29. den Hollander N, Riley D, Befus D. (1988) Immunology of giardiasis. *Parasitol. Today.* 4:124-31.
30. Diaz-Barriga F, Santos MS, Mejía J, Batres L, Yáñez L, Carrizalez L, Vera E, Del Razo LM, Cebrián ME. (1993). Arsenic and Cadmium Exposure in Children Living Near a Smelter Complex in San Luis Potosí, México. *Environ. Res.* 62: 242-250.
31. Diaz- Barriga F, Santos MA, Batres L, Yáñez L, Carrizales L, Mejía JJ, Vera E, Del Razo LM, Cebrián M. (1992). Health effects in children exposed to arsenic: the San Luis Potosí case. In *International Seminar Proceedings Arsenic in the*

Environment and its incidence on health. 1992. Universidad de Chile. Santiago.
P 41-45.

32. Díaz-Barriga F, Santos MA, Batres L, Yáñez L, Carrizales L, Mejía JJ, Vera E, Del Razo LM, Cebrián M. (1994). "Caracterización del Riesgo en Salud por la Exposición a Metales Pesados en la Ciudad de San Luis Potosí", Reporte Laboratorio de Toxicología Ambiental., Facultad de Medicina, UASLP. 1-64.
33. Diorio C, Cai J, Marmor J, Shinder R, DuBow MS. (1995) "An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homologue is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria", *J. Bacteriol.* 177:2050-6.
34. Druet P, Bernard A, Hirsch F, Weening JJ, Gengoux P, Mahieu P, Brikeland S. (1982). Immunologically mediated glomerulonephritis by heavy metals. *Arch. Toxicol.* 50:187-94.
35. Duncombe VM, Bolin TD, Davis M, Fagan MR, Davis AE. (1980). The effect of iron deficiency, protein deficiency and dexamethasone on infection, re-infection and treatment of *G. muris* in the mouse. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 58 :19-26.
36. Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko, ML, Smith JR, Kagnoff, MF, Guillin FD. (2000). Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-Dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* 164:1478-87.

37. Ey PL, Andrews RH, Mayrhofer G. (1993a). Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology*, 106: 347-356.
38. Ey PL, Darby JM, Andrews RH, Mayrhofer G. (1993b). *Giardia* Intestinalis: detection of mayor genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *Int. J. Parasitol.* 23:591-600.
39. Fahey RC, and Sundquist AR. (1991). Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol.* 64:1-53.
40. Farthing MJ, Keusch GT, Carey MC. (1985) Effects of bile and bile salts on growth and membrane lipid uptake by *Giardia lamblia*. Possible implications for the pathogenesis of intestinal disease. *J. Clin. Invest.* 76:1727-32.
41. Farthing MJ, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA. (1986). Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *Am J. Clin. Nutr.* 43: 395-405.
42. Farthing MJ. (1997). The Molecular Phatogenesis of Giardiasis. *J. Ped. Gastr. Nut.* 24:79-88.

43. Fernandes PD, Assrey J. (1997). Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. Braz. J. Med. Biol. Res. 30:93-9.
44. Fischbein A, Tsang P, Luo JC, Bekesi JG. (1993). The immune system as target for subclinical lead related toxicity. Br. J. Ind. Med. 50:185-6.
45. Foster PL. (1993). Adaptive mutation. The uses of adversity. Annu. Rev. Microbiol. 47:467-504.
46. Franco Garrocho D, Quezada Calvillo R. (1995). "Microscopía de Fluorescencia en el Estudio del Protozoo Parásito *Giardia lamblia*", Memorias del 1er Verano de la Ciencia. 273-76. San Luis Potosí, S.L.P.
47. Gilman RH, Marquis GS, Miranda E, Vestegui M, Martínez H. (1988). Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. Lancet 1: 343-5.
48. Gilman FD, Brown KH, Visvesvara GS, Mondal G, Greenberg B, Sack RB, Brandt F, Khan MU. (1985). Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. Trans. R. Soc. Trop Med Hyg. 79: 469-73.
49. Gillin FD, Hagblom P, Harwood J, Aley SB, Reiner DS, McCaffery M, So M, Guiney DG. (1990). Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:4463-47.

50. Gillin FD, Reiner SD, McCaffery JM. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*, *Annu. Rev. Microbiol.* 50:679-705.
51. Gillin FD, Reiner DS, Gault MJ. (1987). Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia in vitro*. *Science.* 235: 1040-3.
52. Guillon J, al Thamery D, Ferguson A, (1982). Features of small intestinal pathology (epithelial cell Kinetics, intraepithelial lymphocytes, disaccharidases) in a primary *G. muris* infection. *Gut* 31:60-6.
53. Gonsebatt ME. Vega L, Herrera LA, Montero R, Rojas E, Cebrián ME, Ostrosky-Wegman P. (1992). Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat. Res.* 283:91-95.
54. Gonsebatt, M.E., Vega, L., Montero, R., Garcia-Vargas, G., Del Razo, L.M., Albores, A., Cebrian, M.E., Ostrosky-Wegman, P. (1994). Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water., *Mutat. Res.* 313:293-99.

55. Guerrero T.A. (1983). Giardiasis. Sal. Pub. Mex. 25:389-392.
56. Gurr JR, Liu F, Lynn S, Jan KY. (1998). Calcium-dependent nitric oxide production is involved in arsenite induced micronuclei. Mutat. Res. 416:137-48.
57. Heyworth MF. (1992). Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. J. Infect. Dis. 166 83:465-72.
58. Heyworth MF. (1986). Antibody response to *G. muris* trophozoites in mouse intestine. Infect. Immun. 52:568-71.
59. Hiura TS, Li N, Kaplan R, Horwitz M, Seagrave JC, Nel AE. (2000) The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. J. Immunol. 165:2703-11.
60. Hill DR. (1991). *Giardia lamblia*. En: "Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica". Mandell GL., Douglas RG., Bennett JE. Editorial Panamericana. 3a. Edición. Buenos Aires, Argentina. 2240-2246.
61. Horiguchi S, Kiyota I, Endo G, Teramoto K, Shinagawa K, Wakitani F, Konishi Y, Kiyota A, Ota A, Tanaka H. (1992). Serum Immunoglobulin and complement C3 levels in workers exposed to lead. Osaka City Med. J. 38: 149-153.

62. Hwillard H, Merrid LL, Dean JR. (1982) Métodos Instrumentales de Análisis. Editorial Continental. Tercera Edición.
63. Iyengar GV, Nair PP. (2000). Global outlook on nutrition and the environment: meeting the challenges of the next millennium. *Sci. Total Environ.* 249:331-46.
64. Kägi JHR, Kojima Y. (1987). Metallothionein II^o. *Experientia*, Editorial Birkhäuser Verlag Basel. 52 (supp):25-61.
65. Khanna R, Kum K, Vinayak VK. (1990). Gut-associated immune effector responses in immunocompetent and immunocompromised mice with *Giardia lamblia*. *FEMS Microbiol. Immunol.* 2 : 137-45.
66. Khanna R, Vinayak VK, Metha S, KumKum Nain CK. (1988). *Giardia lamblia* infection in immunosuppressed animals causes severe alterations to brush border membrane enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 33:1147-52.
67. Kerkvliet NI, Stepan LB, Koller LD. and Exon JH. (1980). Immunotoxicology studies of sodium arsenate-effects of exposure on tumor growth and cell-mediated tumor immunity, *J. Environ. Phatol. Toxicol.* 4:65-79.
68. Knight R. Epidemiology and transmission of giardiasis. (1989). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74:433-6.

69. Koike E, Kobayashi T, Murakami M, Mc William AS, Hoit PG. (1999). Mechanisms of ozone-induced inhibitory effect of bronchoalveolar lavage fluid on alveolar macrophage-mediated immunosuppressive activity in rats. *J. Leukoc. Biol.* 66(1):75-82.
70. Kronenberg S, Lai Z, Esser C. (2000). Generation of alphabeta T-cell receptor+ CD4+ CD8+ cells in major histocompatibility complex class I- deficient mice upon activation of the aryl hydrocarbon receptor 2,3,7,8-tetrachlorodebenzo-p-dioxin. *Immunology.* 100: 185-95.
71. Lacroix G, Lambre C. (1998). Ozone and immune system. *Rev. Mal. Respir.* 15:699-711.
72. Lantz RC, Parlman G, Chen GJ, Barber D, Winski S, Carter DE. (1995). Effect of arsenic exposure on alveolar macrophage function. II. Effect of slightly soluble forms of As (III) and As (V), *Environ. Res.* 68:59-67.
73. Leder k, Welller PF. *Giardiasis.* (1999). Uptodate®
74. Lev B, Ward H, Keusch GT. (1986). Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: A novel host-parasite interaction. *Science.* 232:71-3.
75. Lujan HD, Nash TE. (1994). The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41:169-75.

76. Luster MI, Dean JH. (1982) Immunological hypersensitivity resulting from environmental or occupational exposure to chemicals: A-state-of-the-art workshop summary. *Fundamental Appl. Toxicol.* 2:327-32.
77. Majewska C, Kasprozak W, Janckheere JF, Kaczmarek E. (1991). Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole andomidazole. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85:67-69.
78. McCulloch R, Rudenko G, Borst P. (1997). Gene conversions mediating antigenic variation in *Trypanosoma brucei* can occur in variant surface glycoprotein expression sites lacking 70 base-pair repeat sequences. *Mol Cell. Biol.* 17: 833-843.
79. Mintz ED, Hudson-Wragg M, Mshar P, Cartter ML, Hadler JL. (1993). Foodborn giardiasis in a coporate office setting. *J. Infect. Dis.* 167:250-3.
80. Nash TE. (1992). Surface antigen variability and variation In *Giardia lamblia*. *Parasitol. Today.* 8:229-234.
81. Nash TE, Keiser DB. (1985a). Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia* . *J. Infect. Dis.* 152:1166-71.

82. Nash TE, McCutchan T, Keister D.(1985b). Restriction endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J Infect. Dis. 152: 64-73.
83. Nash TE, Mowatt MR. (1993). Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90:5489-93.
84. Neuhaus-Steinmetz U, Uffhausen F, Herz U, Renz H. (2000). Priming of allergic immune responses by repeated ozone exposure in mice. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 23:228-33.
85. Nordstrom M, Hardell L, Lindstrom G, Wingfors H, Hardell K, Linde A. (2000). Concentrations of organochlorines related to titers to Epstein-Barr virus early antigen IgG as risk factors for hair cell leukemia. Environ. Health. Perspect. 108: 441-5.
86. Owen RL, Nemanic PC, Stevens DP. (1979). Ultrastructural observations on giardiasis in a murine model: I. Intestinal distribution, attachment and relationship to the immune system of *G. muris*. Gastroenterology 76:757-69.
87. Oyerinde PO, Ogunbi P, Alongué AA. (1977). Age and sex distribution of infections with *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis* in the Lagos population. Int. J. Epidemiol. 6:231-4.

88. Parker CW. 1982. Allergic reactions in man. *Pharmacol. Rev.* 34:85-104.
89. Petersen LR, Cartter ML, Hdler JL (1988). A food borne-outbreak of *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 157:846-8.
90. Peterson H. (1972). Giardiasis (lambliasis). *Scand. J. Gastroenterol.* (Suppl 14:1-44.
91. Polis MA, Tuazon CU, Alling DW. (1986) Transmission of *Giardia lamblia* from a day care center to the community. *Am J. Public Health.*78:139-43.
92. Pyatt DW, Stillman WS., Irons RD. (1998). Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149: 178-84.
93. Queiroz ML., Costa, FF, Bincoletto C, Perlingeiro RC, Dantas DC, Cardoso MP, and Almeida M. (1994). Engulfment and killing capabilities of neutrophils and phagocytic function in persons occupationally exposed to lead. *J. Immunopharmacol.* 16:239-244.
94. Raytapadar S, Datta R, Paul AK. (1995). Effects of some heavy metals on growth, pigment and antibiotic production by *Streptomyces galbus*. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* 42:171-7.

95. Roberts-Thomson IC, Mitchell GF. (1987). Giardiasis in mice. I. Prolonged infections in certain mouse strains and hypotymic (nude) mice. *Gastroenterol.* 75:42-46.
96. Robinson NJ, Whitehall SK, Cavet JS. Microbial metallothioneins. (2001). *Adv. Microb. Physiol.* 44:183-213.
97. Saha TK, Gosh TK.(1977) Invasion of small Intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology* 72:402-5.
98. Salazar G , Schettino PM, García Y. (1981). *Sal Pub. Mex.* 22:179-182.
99. Schurman HJ, Kuper CF, Vos JG.(1994) Histopathology of the Immune system as a tool to assess immunotoxicity. *Toxicology* 86: 187-212.
100. Sikorski EE, McCay JA, White KI Jr, Bradley SG, and Munson AE. (1989). Immunotoxicity of semiconductor gallium arsenide in female B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13:843-858.
101. Sikrosky EE, Burns LA, McCoy KL, Stern M, Munson AE. (1991). Suppression of splenic accessory cell function in mice exposed to gallium arsenide. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 110 :143-156.

102. Singer SM, Nash TE. (2000). T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun.* 68:170-5.
103. Silver S and Phung LT. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Ann. Rev. Microbiol.* 50:753-789.
104. Snider DP, Skea D, Underdawn BJ. (1988). Chronic giardiasis in B-cell deficient mice expressing the *xid* gene. *Infect Immun.* 56:2838-42.
105. Snider DP, Gordon J, McDermonitt MR, Underdown BJ. (1985). Chronic *G. muris* infection in anti-IgM treated mice. I. Analysis of immunoglobulin and parasite-specific antibody in normal and immunoglobulin-deficient animals. *J Immunol.* 134:4153-62.
106. Snider DP, Underdawn BJ (1986). Quantitative and temporal analysis of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *G. muris*. *Infect. Immun.* 52:271-8.
107. Street JC, Sharma RP. (1974). Quantitative aspects of immunosuppression by select pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 29:135-36.
108. Takafuji S, Nakagawa T. (2000). Air pollution and allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 10: 5-10.

109. Tandon BN, Tandon RK, Satpathy BK. (1977). Mechanism of malabsorption in giardiasis: A study on bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. *Gut* 18:176-81.
110. Tchounwou PB, Wilson B, Ishaque A. (1999). Important considerations in the development of public health advisories for arsenic-containing compounds in drinking water. *Rev Environ, Health*. 14: 211-29.
111. Tone K, Suzuki T, Todoroki T. (1991a) "Influence of lead on the active oxygen production of phagocytic cells in the mouse experiment". *Kitasato Arch. Exp. Med.* 64:157-60.
112. Tone, K, Suzuki, T, Todoroki, T, Matsui S. (1991b). Influence of lead on the host's defense mechanisms (1)-Influence of lead on antibody production. *Kitasato Archives of Experimental Medicine*. 64:65-72.
113. Towson SM, Boreham PF, Upcroft P and Upcroft JA. (1994). Resistance to the nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop. (Basel)* 56:173-94.
114. Towson SM, Hanson GR, Upcroft JA and Upcroft P. (1994) A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur . J. Biochem* 220:439-446.
115. Turchany JM, Aley SB, Gillin FD. (1995). Giardicidal activity of lactoferrin and N-terminal peptides. *Infect. Immun.* 63:4550-2.

116. Turner JS, Robinson NJ, Gupta A. (1995a). Construction of Zn²⁺/Cd²⁺-tolerant cyanobacteria with a modified metallothionein divergon: further analysis of the function and regulation of *smt*⁺. J. Ind. Microbiol. 14:259-64.
117. Turner JS, Robinson NJ. (1995b). Cyanobacterial metallothioneins: biochemistry and molecular genetics. J. Ind. Microbiol. 14:119-25.
118. Upcroft JA, Healey A, Murray DG, Boreham PF, Upcroft P. (1992) A gene associated with cell division and drug resistance in *Giardia duodenalis*. . Parasitology 104:397-405.
119. Upcroft JA, Upcroft P. (1998). My favorite cell: *Giardia* . BioEssays 20:256-263.
120. Villanueva SF, Botello AV. (1998). Metal Pollution in costal areas of Mexico. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 157: 53-94.
121. Ward HD, Alroy J, Lev BI, Keusch GT, Pereira ME. (1985). Identification of chitin as structural component of *Giardia* cysts. Infect. Immun. 49:629-34.
122. Warren TK, Mitchell KA, Lawrence BP. (2000). Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppress the humoral and cell-mediated immune responses to influenza A virus without affecting cytolytic activity in the lung. Toxicol Sci. 56: 114-23.

123. Welsh JD, Poley JR, Hensley J. (1984) Intestinal disaccharidase and alkaline phosphatase activity in giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3:37-40.
124. White C, Sayer JA, Gadd GM. (1997). Microbial Solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiol. Rev.* 20 :506-16.
125. Winer BJ. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill. New York.
126. Wolfe MS. (1992). Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:93-100.
127. Yoshida T, Shimamura T, Shigetas T. (1986) Immunological effects of arsenic compounds on mouse spleen cells *in vitro*. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 11:353-59.
128. Yoshida T, Shimamura T, Shigetas. (1987). Enhancement of the immune response *in vitro* by arsenic. *International Journal of Immunopharmacology.* 9:411-15.
129. Yu HS, Chang KL, Wang CM, Yu CL. (1992). Alterations of mitogenic responses of mononuclear cells by arsenic in arsenical skin cancers. *J. Dermatol.* 19:710-714.

130. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Wu CS, Chen GS, Ho JC. (1998). Defective II-2 receptor expression on lymphocytes of patients with arsenic induced Bowen's disease. Arch. Dermatol. Res. 290:681-687.
131. Zanobetti A, Schwartz J, Gold D. (2000). Are there sensitive subgroups for the effects of airborne particles? Environ. Health. Perspect. (9):841-5.
132. Zhang YY, Aley SB, Stanley SL Jr, Gillin FD. (1993). Cysteine-dependent zinc binding by membrane proteins of *Giardia lamblia*. Infect. Immun. 61:520-24.

