



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

***“NIVELES IFN- γ E IL-4 EN NIÑOS EXPUESTOS
AMBIENTALMENTE A METALES EN UNA ZONA
MINERA”***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

BLANCA AZUCENA MALDONADO LEMUS

DIRECTORA DE TESIS: M en C. Ma. ELENA MORENO GODÍNEZ

CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DEL 2008.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de toxicología de la Universidad Autónoma de Guerrero y en el Laboratorio de Inmunotóxicología de la Sección Externa de Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

Bajo la dirección de:

M en C. Ma. Elena Moreno Godínez y Dra. Emma S. Calderón Aranda

Y la asesoría de:

M en C. Eugenia Flores Alfaro
M en C. Daniel Sotelo Hernández
Dra. Emma R. Leyva Salgado

Con la importante colaboración en el entrenamiento del manejo de muestras y estandarización de las técnicas de cuantificación de citocinas:

M en C. Leonor C. Acosta Saavedra
(CINVESTAV)

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Blanca Azucena Maldonado Lemus, recibió beca CONACYT.

Parte de este proyecto fue financiado por Fomix-GUE-2002-C01 5456.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de Tesis M. en C. Ma. Elena Moreno Godínez y Dra. Emma S. Calderón Aranda; de forma muy especial por su tiempo, dedicación y empeño.

A mis asesores, Dra. Emma R. Leyva Salgado, M. en C. Daniel Sotelo Hernández, y M. en C. Eugenia Flores Alfaro, por compartir sus valiosas experiencias en la realización de esta investigación.

A la Dra. Eva González Jasso, por su amable colaboración para el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Berenice Illádes Aguiar, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, Dr. Alfonso Bernabé Carreño, Lic. Celestino Pineda Vargas, Ing. David Tapia Bravo, por creer en mí y ayudarme a alcanzar esta meta.

Al M en C. Miguel Ángel Rodríguez Barrera por su absoluta disposición para la culminación de este trabajo.

Mil gracias

DEDICATORIA

A mis hijos ***Samantha, Denisse y José Manuel*** como un testimonio de gratitud, porque su presencia ha sido y será siempre el motivo más grande que me ha impulsado para lograr esta meta. Con todo mi amor.

A todos los que les debo lo que soy, porque con sus esfuerzos, sacrificios y sin pedir nada a cambio, compartieron mi sueño.

Por que mi trofeo, es también suyo.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Introducción	1
Material y métodos	5
Resultados	8
Discusión y conclusión	12
Referencias	17

RESUMEN

Los metales liberados de residuos mineros (jales) son contaminantes ambientales que representan riesgos potenciales a la salud, principalmente para poblaciones vulnerables, como la infantil. Las citocinas son proteínas solubles, reguladoras del sistema inmunológico y son un blanco sensible por la exposición a metales. En niños expuestos ambientalmente a metales en una zona minera de Taxco Guerrero, se ha encontrado que presentan niveles de metales por encima del valor de referencia para Cr, Ni, Ba, Co, Mn, Pb, Cd, Cu y As, y estos afectaron los niveles de expresión del RNAm de citocinas tipo Th1/Th2. El objetivo de este estudio fue cuantificar en esta población, los niveles plasmáticos de Interferón gamma (IFN- γ) e Interleucina 4 (IL-4) y evaluar su asociación con las concentraciones de metales. Se estudiaron 48 niños (52% niñas) que viven cerca de jales mineros en cinco comunidades de Taxco Guerrero, con una edad de 6 a 11 años (8.4 ± 1.4 años). Los niveles de citocinas INF- γ e IL-4, fueron determinadas por la técnica de ELISA. Los niveles promedio para IFN- γ fue 0.32 pg/ml (rango de 0.04-13.4 pg/ml) y para IL-4 de 0.04 pg/ml (rango de 0.04 -12.5 pg/ml). Los modelos lineales generalizados ajustados por edad, genero y talla, mostraron una asociación positiva entre los niveles de IFN- γ y las concentraciones de Cd en orina ($\beta=62.97$, $p=0.0003$), así como una asociación negativa entre los niveles de IL-4 y las concentraciones de Ni en orina ($\beta=-3.63$, $p=0.05$). Estos resultados sugieren, que la exposición ambiental a Cd y Ni influye en los niveles plasmáticos de estas citocinas al provocar un incremento de IFN- γ y probablemente, esto sea la manifestación de algún proceso inflamatorio ligado a efectos tóxicos tempranos por estos metales que eventualmente estén asociados al desarrollo de hipersensibilidades. Sin embargo, es necesario comprobar la existencia de una asociación causal y los mecanismos que la provocan, a través de estudios subsecuentes. En conclusión, los niños que viven expuestos a metales liberados de jales mineros en Taxco Guerrero, pueden desarrollar desequilibrios inmunológicos que ponga en riesgo su salud.

Palabras clave: niños, Interferón- γ , Interleucina-4, jales mineros, metales.

ABSTRACT

The metals released from mining waste (tailings) are environmental pollutants that represent potential risks to health, especially for vulnerable populations such as children. Cytokines are soluble proteins, regulators of the immune system and are a sensitive target by exposure to metals. In children exposed to environmentally metals in a mining area of Taxco Guerrero, found that levels of metals above the reference value for Cr, Ni, Ba, Co, Mn, Pb, Cd, Cu and As, which affect the levels of RNAm Th1/Th2 cytokine. The aim of this study was determined in this population, the plasma levels of interferon gamma (IFN- γ) and Interleukin 4 (IL-4) and evaluated its association with the concentrations of metals. We studied 48 children (52% girls) who live near miners tailings in five communities, aged between 6 to 11 years (8.4 ± 1.4 years). The levels of IFN- γ and IL-4, were determined by the ELISA. The average Levels of cytokines INF- γ was 0.32 pg/ml (range 0.04-13.4 pg/ml) for IL-4 0.04 pg/ml (range 0.04-12.5 pg/ml). The generalized linear models adjusted for age, gender and height, showed a positive association of levels IFN- γ , and concentrations of Cd in urine ($\beta = 62.97$, $p = 0.0003$), as well a negative association between levels of IL-4 and concentrations of Ni in urine ($\beta = -3.63$, $p = 0.05$). These results suggest that environmental exposure to Cd and Ni, can influence the plasmatic levels of these cytokines and probably the manifestation of inflammatory damage linked to toxic effects early by these metals, or eventually by development hypersensitivity. However, it is necessary to verify the existence of a causal association and the mechanisms of the effect, through further studies. In conclusion, children living exposed to the metal released from the mining tailings in Taxco Guerrero, immunological can develop imbalances that endanger their health.

Keywords: children, Interferon- γ , Interleukin-4, mining tailings, metals.

INTRODUCCIÓN

La explotación minera es causa de contaminación ambiental por metales debido a la acumulación de toneladas de residuos mineros (jales) que son abandonados sin ninguna medida de bioremediación^[1-2]. La liberación de metales desde estos sitios, ocurre al oxidarse minerales sulfurados a través de la descarga de lixiviados, lo que contamina ríos y suelos, esto representa un serio problema ambiental y de impacto a la salud sobre todo para poblaciones que viven cerca de zonas mineras^[3-6]; refinerías y complejos de fundición en áreas urbanas^[7-9]. Se conocen algunos efectos agudos ocasionados por la exposición a altos niveles de metales^[10-16]. Existen reportes que el cadmio (Cd) y el arsénico (As) afectan al sistema urinario^[10,11]; el As, el níquel (Ni), el cobalto (Co) y el cromo (Cr) producen alteraciones dérmicas^[12,14]; el As, el Ni, el Co, el Cr, el Cd y el mercurio (Hg) desarrollan toxicidad a nivel respiratorio^[15-20]; el Hg y el plomo (Pb) inducen alteraciones en el sistema nervioso^[21-23] y el zinc (Zn), el Pb, el As, el Ni, el Co, el Cr, el Pb, el Au y el Hg producen efectos tóxicos sobre el sistema inmune^[7-9,24-40].

Existe evidencia insuficiente sobre efectos tóxicos de los metales ocasionados por la exposición crónica a concentraciones bajas de metales. Estudios recientes han sugerido que dentro de éstos efectos esta la inmunotoxicidad (inmunosupresión y/o inmunoestimulación)^[24-30]. Se ha propuesto que la activación inmunológica es un factor asociado a un aumento en el riesgo para el desarrollo de alergias y enfermedades autoinmunes; mientras que la inmunosupresión puede condicionar a un incremento en el riesgo para el desarrollo de infecciones y algunos tipos de cáncer^[17,18,26-29]. Con relación a la exposición a metales, el Ni y el Cr han sido asociados a dermatitis por contacto^[13,31]; el Pb y el Hg a autoinmunidad^[27,32]; mientras que el Cd y As, se han asociado a inmunodeficiencia^[7,33,34]. Algunos autores explican estos efectos por el desbalance que provocan los metales en la razón Th1/Th2^[26,35,36].

Las citocinas han sido usadas como biomarcadores de efectos inmunotóxicos tempranos ocasionados por metales^[37,38]. En ese sentido, Lemarie *et al.*,^[34] en un modelo *in vitro*, en el que evalúa el efecto del As sobre células mononucleares de sangre periférica, encuentra que a concentraciones no citotóxicas de 0.5 – 1 μ M provoca alteraciones fenotípicas y funcionales, sobre los monocitos/macrófagos, debido a que disminuye la diferenciación celular y la capacidad fagocítica; sugieren que estos efectos inmunosupresores podrían deberse a que el As induce la activación de proteínas que tienen que ver con la retracción de la actina del citoesqueleto. También observaron que la estimulación de estas células con lipopolisacáridos bacterianos (LPS) indujo niveles incrementados en la expresión de RNA mensajero (RNAm) de citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), IL-8 y una disminución en marcadores de adhesión celular como CD1b y CD29. Por otro lado, Pineda *et al.*,^[7] en un estudio en población infantil ambientalmente expuesta por el consumo de agua contaminada con As (>50 μ g/l As en orina), reportan efectos inmunosupresores sobre la respuesta tipo Th1 al alterar la función fisiológica del macrófago activado por la disminución en la producción de óxido nítrico. También se ha reportado una disminución significativa en la proliferación celular, en la secreción de IL-2 y en la razón linfocito T colaborador/Linfocito T citotóxico (Th/Tc), así como una disminución en los niveles de expresión del RNAm de IL-2^[9,39-40]. Con relación a esto, se ha reportado que el As tiene efectos inhibitorios a dosis de 1 a 10 μ M, no solo en la diferenciación de monocitos, sino también en la activación de linfocitos T, al alterar la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) que intervienen en la transcripción del gen de IL-2^[33].

Otro tipo de inmunosensibilizaciones han sido investigadas en ganglios poplíteos de ratones albinos (BALB/C), expuestos de 1 a 50 μ g de CdCl, PbCl y HgCl, donde se encontró un incremento significativo en la proliferación celular en el siguiente orden Pb>Hg>Cd. Sin embargo, al exponer estas células a un mitógeno, el Cd incrementó significativamente la proliferación celular, pero sólo con respecto a los controles. Para los tres casos, la respuesta inmunoestimulada fue de tipoTh2, lo que sugiere

que pueden estar involucrados en el desarrollo de alergias por el contacto con fuentes de exposición a estos metales ^[41].

Minang *et al.*,^[42] encontraron que pacientes alérgicos a Ni, producen una mezcla de citocinas Th1 (IL-2 e INF- γ) y Th2 (IL-4 e IL-13) producidas in vitro en cultivos de PBMC, también observaron que estas células al ser expuestas a Co, Cr, oro (Au) y paladio (Pd) producen un perfil similar al desarrollado por el Ni, esto sugiere que los metales actúan como haptenos y pueden desarrollar una reactividad cruzada en la respuesta, ya que presentan propiedades físicas y químicas muy parecidas^[36]. Por otro lado, Misrha *et al.*,^[8] encontraron un incremento significativo de IFN- γ en los sobrenadantes de PBMC estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) de trabajadores expuestos a plomo, pero no se encontró diferencia significativa en los niveles de IFN- γ de suero y de sobrenadantes de cultivos de células PBMC no estimulados en el mismo grupo de estudio.

Recientes estudios han descrito que las poblaciones infantiles son más vulnerables a efectos adversos por la exposición a tóxicos ambientales que los adultos^[43]. La disminución del coeficiente intelectual se ha encontrado en niños con niveles de Pb menores al valor de referencias (5 a 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ en sangre)^[21,45]. Por otro lado, se ha reportado una relación positiva entre los niveles de Pb con los niveles de IgE en niños de 9 meses a 6 años de edad, expuestos a ambientes urbanos, con niveles de 1 a 45 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de Pb en sangre. Esto sugiere que los niños expuestos a fuentes de Pb pueden desarrollar alergias, por la estimulación en la producción de IgE ^[27].

La región de Taxco, ubicada al norte del estado de Guerrero México, ha sido desde la época colonial una zona de explotación minera, lo que ha generado la acumulación de cuatro depósitos de jales contiguos a comunidades rurales^[5]. Se ha evaluado el potencial de contaminación en esta zona, reportándose que los jales liberan metales como Cd, Cu, hierro (Fe), manganeso (Mn), Zn, Pb y As en forma de iones libres a través de la formación de drenaje ácido y lixiviado^[5,6]. Estos últimos se utilizan como fuente de agua alternativa para uso doméstico, conteniendo niveles de

Fe, Pb y Mn que superan los límites permitidos para uso de agua potable. También fue reportado que el Cu, Cd y As, se encuentran por encima de los estándares permitidos para aguas residuales de origen industrial^[46].

En un estudio de biomonitoreo en población infantil realizado en el 2003, se muestra que niños en edad escolar (6 a 11 años) residentes de esta zona minera presentan niveles de metales por arriba de los valores de referencia para Ni, Cd, Mn, Pb, As, Hg, Cr, Co, y bario (Ba). Al evaluar el efecto sobre la respuesta inmune, en dicho estudio se encontró una asociación negativa de los niveles de Pb sobre los niveles de RNAm de IFN- γ , en PMBC estimulados y no estimulados con PHA de esta población, así como una asociación negativa del Cd con los niveles del RNAm de IL-12, en cultivos no estimulados; interesantemente, en ese estudio, no se encontró asociación significativa de los niveles de expresión de las citocinas tipo Th2 evaluadas (IL-4 e IL-10) con los niveles de exposición a metales encontrados en la población. Por ello, se sugirió que la exposición a metales en esta población disminuyó la respuesta Th1, sin afectar la expresión de los mensajeros de la respuesta de tipo Th2, que probablemente resultaría en un incremento en el riesgo de padecer infecciones ocasionadas por patógenos intracelulares y procesos alérgicos^[47].

Todas estas investigaciones sustentan la sensibilidad del sistema inmunológico a los efectos por la exposición a ambientes contaminados por metales. Sin embargo, es escasa aun la información que se conoce acerca de las posibles alteraciones inmunológicas a nivel de proteína, que pueden desarrollar los niños expuestos a mezclas heterogéneas de metales, por vivir cerca a jales mineros. Por tanto, el objetivo de este estudio, fue cuantificar los niveles plasmáticos de citocinas IFN- γ e IL-4 y evaluar su asociación con los niveles de metales determinados en la población infantil residente de localidades de Taxco Guerrero. Esta información será útil en el desarrollo de nuevas estrategias y directrices para la detección y prevención de enfermedades causada por la contaminación ambiental por metales en niños que viven cercanos a zonas mineras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño metodológico.

El estudio se realizó en una muestra de 48 niños de ambos sexos, de 6 a 11 años de edad, originarios de las comunidades de Cacalotenango, Santa Bárbara, El Fraile, Santa Rosa y Dolores, todos ellos del municipio de Taxco de Alarcón Gro., que asistían a escuelas primarias oficiales de las comunidades mencionadas, que aceptaron participar en el estudio y contaban con el consentimiento informado de sus padres o tutores.

Los criterios considerados al momento del muestreo fueron: no presentar inmunosupresión primaria o secundaria, infecciones virales o bacterianas, tratamiento con antibióticos e inmunización dos semanas antes de la toma de la muestra. Las concentraciones de metales que previo a este estudio fueron determinadas y que se presentaron como antecedentes de cada uno de los niños, fueron Ba, Co, Cu, Mn, Cd, Cr, Ni, Mo, Fe, Zn y estroncio (Sr), que se cuantificaron en la primera orina de la mañana, a través de espectrofotometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). El As se determinó por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruro (HG-AAS) y los niveles de Hg se midieron por espectrometría de absorción atómica por vapor frío (CVAAS). El Pb fue el único metal determinado en sangre y las concentraciones fueron medidas por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS)^[47].

Los tamaños de muestra para Ba, Co, Cu, Mn, Cd, Cr, Ni, Mo, Fe, Zn y Sr, fue de 34 (20 niñas) y para Hg, Pb y As fue de 48 (25 niñas). Los valores de referencia considerados para cada metal fueron los siguientes: As 15 µg/L^[48]; Pb 5 µg/dl^[49]; Hg 0.7 µg/L^[48]; Cd 0.5 µg/L^[48]; Cr 0.59 µg/L^[49]; Ni 7.3 µg/L^[49]; Ba 5.4 µg/L^[49]; Co 2.2 µg/L^[49]; Cu 26 µg/L^[49]; Mn 0.25 µg/L^[49]; Mo 117 µg/L^[49]; Sr 394 µg/L^[49]; Fe (No existen valores de referencia en orina); Zn 1026 µg/L^[49].

Cuantificación de IFN- γ e IL-4.

La cuantificación de los niveles de IL-4 e IFN- γ en plasma, se realizó por el método de ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Asssay) de acuerdo a las instrucciones de los kits comerciales utilizados (Biosource), kit IFN- γ KHC4022 y kit IL-4 KHC0042, con una sensibilidad de <4 y <2 pg/ml, respectivamente. Cada experimento se realizó por duplicado y se consideró un coeficiente de variación intra e inter ensayo menor al 10%.

Se usaron anticuerpos específicos anti-citocina, dirigidos contra epítopes secuenciales fijos a microplacas de 96 pozos (anticuerpo de captura). Se adicionó plasma a cada uno de los pozos y un segundo anticuerpo policlonal conjugado con biotina (anticuerpo de detección) que reconoce un segundo sitio antigénico secuencial de la citocina. La presencia del complejo inmunológico se detectó con estreptavidina unida a la enzima peróxidasa y se reveló mediante la adición del sustrato. El producto final se midió a una longitud de onda de 450 nm en un espectrómetro de microplacas (Espectra Max 250), contra un blanco. Las concentraciones fueron calculadas a partir de una curva estándar para cada una de las citocinas.

Análisis de datos

Para el análisis descriptivo de los datos, se muestran frecuencias para variables cualitativas, media o mediana y desviación estándar o rangos, para las cuantitativas. Para el análisis descriptivo de los niveles de las citocinas, se definieron dos grupos considerando como punto de corte el valor de la mediana para cada citocina. Las comparaciones de la distribución de los datos entre los grupos se hicieron aplicando la prueba de *t* de student's y Mann-Whitney. En la estimación de la relación lineal entre los niveles de citocinas con parámetros como edad, talla y metales se aplicó correlación de Spearman.

Modelos lineales generalizados^[50], fueron aplicados para evaluar la asociación entre los metales y las citocinas, ajustando cada modelo con edad, género y talla. Los coeficientes se reportan en datos no transformados. Para fines del análisis los valores de citocinas que estuvieron por debajo del límite de cuantificación (LC) se consideraron como LC/2. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todo el análisis se realizó con el programa Stata versión 9.2.

RESULTADOS

La población infantil estudiada consistió de 52% niñas, con una edad promedio de 8.4 (6±1.4 años) y con una talla de 1.29 ± 0.08 m.

Los niveles de metales determinados en la población a través del biomonitoreo en muestras de orina, excepto el Pb que se midió en sangre, realizado por Moreno *et al.*,⁽⁴⁷⁾ se muestran en la tabla 1, en donde se puede observar que el 100% de los niños presentaron niveles de Cr, Ni, Ba, Co y Mn por arriba de los valores de referencia (VR) y más del 46% presentó niveles de Pb, Cd, As y Cu superiores a los VR.

Tabla 1. Concentraciones de metales y porcentaje de niños con niveles mayores a los valores de referencia, que viven en localidades de una zona minera del municipio de Taxco, Guerrero.

Metal µg/L	n	Concentración (µg/L) ^a	% De niños con concentraciones > VR		
			Total	Niños	Niñas
			%	n(%)	n(%)
Ba	34	18.4±4.22	100	14(100)	20(100)
Co	34	18.4±9.87	100	14(100)	20(100)
Cu	34	29.4±6.90	65	11(79)	11(55)
Mn	34	5.1±0.71	100	14(100)	20(100)
Pb	48	9.3±3.4	92	21(91)	23(91)
As	48	15(4.2-35.4)	46	11(48)	11(44)
Hg	48	0.7(<LOQ-3.9)	31	8 (35)	7 (28)
Cd	34	4(<LOQ-14)	91	14 (100)	17 (85)
Cr	34	15(10-29)	100	14(100)	20(100)
Ni	34	83(25-124)	100	14 (100)	20 (100)
Mo	34	52(17-142)	3	3(7)	0(0)
Sr	34	45(25-162)	0	0(0)	0(0)
Fe	34	25(25-101)	ND	ND ^b	ND ^b
Zn	34	628(25-2605)	9	0 (0)	3(15)

VR Valores de referencia para los metales.

LOQ: Límite de cuantificación con el método analítico.

^a Los datos representan la media ± DE ó mediana y (rango).

^b ND no existen valores de referencia para el Fe en orina.

Niveles de citocinas en plasma

Las concentraciones promedio para IFN- γ en las muestras de plasma en los niños fueron 0.32 pg/ml (rango 0.04 - 12.53 pg/ml) y para IL-4 de 0.04 pg/ml (rango 0.04-13.4 pg/ml). La tabla 2 resume la distribución de las concentraciones de metales en dos grupos definidos por el punto de corte que corresponde al valor de la mediana de la concentración de citocinas, estos resultados muestran que alrededor del 50% de los niños presentó niveles menores al valor de la mediana para ambas citocinas. Los datos mostraron una diferencia significativa entre los grupos en los niveles de Pb y Fe, observando que los niños con mayores niveles de Pb, tienen menores niveles de IFN- γ ($p=0.04$) y aquellos con mayores niveles de Fe tuvieron mayores niveles de IFN- γ ($p=0.03$). Esto sugiere, que niveles incrementados de estos metales, pueden influenciar los niveles plasmáticos de IFN- γ ; sin que se hayan identificado ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos para el caso de IL-4.

El IFN- γ es una citocina tipo Th1 e IL-4 de tipo Th2. Para evaluar la razón Th1/Th2 y la confiabilidad de nuestras mediciones, evaluamos la distribución de los niveles plasmáticos de IFN- γ y de IL-4 en cada uno de los niños (datos no mostrados). Se encontró que el 16% (8 niños) presentaron niveles de IL-4 por encima del percentil 75 y niveles de IFN- γ muy próximos al percentil 25; por el contrario 25% (12 niños) presentaron niveles por encima del percentil 75 para IFN- γ y niveles de IL-4 próximos al percentil 25. Esto sugiere que la respuesta inmunológica de poco menos de la mitad (41.5%) de la población, presentan una polarización hacia un tipo de respuesta (Th1 o Th2), siendo la de tipo Th1 donde se ubicó una proporción mayor (25%).

Análisis de asociación de los niveles de IFN- γ y de IL-4 con los niveles de metales.

Con el propósito de determinar las potenciales relaciones lineales, se evaluó la correlación entre los metales con la edad, talla y las citocinas estudiadas, no se encontró ninguna asociación significativa entre estos parámetros, excepto con el Co,

que mostró una asociación positiva marginal ($p = 0.05$) con la talla de los niños (Tabla 3).

En la evaluación de la asociación cruda (no ajustada) y ajustada por edad genero y talla, se encontró un incremento en los niveles promedio de IFN- γ asociado a los niveles urinarios de Cd ($\beta= 62.97$, $p= 0.003$) y una disminución en los niveles promedio de IL-4 asociado a los niveles urinarios de Ni ($\beta= -3.63$, $p= 0.05$) (Tabla 4 y 5), lo que podría sugerir que la exposición a estos metales afecta negativamente la respuesta inmune tipo Th2 al alterar positivamente los niveles plasmáticos de IFN- γ y negativamente los niveles plasmáticos de IL-4.

Tabla 2. Niveles de citocinas y concentraciones de metales, en muestras de niños que viven en localidades de una zona minera del municipio de Taxco, Guerrero.

Metal $\mu\text{g/L}$	IFN- γ (pg/ml) 0.32(0.04-13.4) ^a		Valor p	IL-4(pg/ml) 0.04(0.04-12.5) ^a		Valor p
	n(%) 25(52)	n(%) 23(48)		n(%) 27(56)	n(%) 21(44)	
	≤ 0.32	>0.32		≤ 0.04	>0.04	
Ba^b	19 \pm 4.5	18 \pm 4	0.7	19 \pm 4	17 \pm 4	0.1
Co^b	19 \pm 13	18 \pm 7	0.7	17 \pm 10	21 \pm 9	0.1
Cu^b	30 \pm 8	29 \pm 6	0.7	29 \pm 7	30 \pm 7	0.6
Mn^b	5 \pm 0.7	5 \pm 0.6	0.3	5 \pm 0.7	5 \pm 0.6	0.1
Pb^b	10 \pm 3	8 \pm 4	0.04*	9 \pm 3	9 \pm 4	0.2
As	15(7-35.4)	14(4.2-31.1)	0.1	16(4.2-35.4)	13(7-31.1)	0.8
Hg	0.7(<LOQ -3.9)	0.7(<LOQ -2.6)	0.8	0.7(<LOQ -3.9)	0.7(0.7-3.5)	0.6
Cd	4(<LOQ -11)	4(<LOQ -14)	0.5	4(<LOQ-11)	4(<LOQ-14)	0.7
Cr	15(10-29)	15(10-20)	0.3	15(10-29)	15(10-23)	0.5
Ni	89(25-124)	75(25-108)	0.3	88(25-120)	75(25-124)	0.5
Mo	50(20-99)	52(17-142)	0.9	52(17-99)	52(27-142)	0.4
Sr	38(25-94)	47(25-162)	0.9	44(25-94)	49(25-162)	0.4
Fe	25(25-101)	26(25-101)	0.03*	25(25-101)	25(25-101)	0.6
Zn	684(25-1200)	594(230-2605)	0.3	560(25-1200)	628(25-2605)	0.6

^a Mediana (rango), los datos se compararon con la prueba de Mann-Whitney.

^b Media \pm DE, los datos se compararon con la prueba de t de Student's.

* $p \leq 0.05$

Tabla 3. Correlación entre la concentración de metales con edad, talla corporal y niveles de IFN- γ e IL-4, en niños que viven en localidades de una zona minera del municipio Taxco, Guerrero.

Metal	Edad		Talla		Citocinas (pg/ml)			
					IFN- γ		IL-4	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Ba	-0.25	0.15	-0.07	0.66	-0.03	0.82	-0.21	0.21
Co	0.05	0.75	-0.32	0.05*	0.08	0.63	0.16	0.34
Cu	-0.06	0.72	0.05	0.77	-0.10	0.56	0.14	0.41
Mn	0.09	0.58	-0.14	0.42	0.12	0.48	-0.09	0.60
Pb	0.24	0.09	0.14	0.30	0.05	0.69	-0.08	0.55
As	-0.19	0.17	-0.10	0.48	0.07	0.60	-0.06	0.63
Hg	0.12	0.39	-0.07	0.61	0.02	0.88	0.11	0.43
Cd	-0.18	0.30	-0.11	0.51	0.23	0.18	0.03	0.85
Cr	0.10	0.54	0.16	0.35	-0.07	0.66	0.00	0.97
Ni	0.03	0.85	-0.15	0.39	0.15	0.38	-0.26	0.13
Mo	0.11	0.51	0.17	0.33	-0.05	0.74	0.14	0.41
Sr	0.01	0.92	0.19	0.25	0.00	0.97	-0.00	0.96
Fe	0.22	0.19	0.21	0.21	0.01	0.93	0.15	0.37
Zn	-0.13	0.46	0.09	0.58	-0.11	0.51	-0.10	0.55

r Coeficientes de correlación de Spearman.

*p \leq 0.05

Tabla 4. Asociación entre la concentración de metales y los niveles plasmáticos de IFN- γ , en niños que viven en localidades de una zona minera del municipio de Taxco, Guerrero.

Metal (μ g/l)	Niveles de IFN- γ (pg/ml)					
	Modelo no ajustado			Modelo ajustado ^a		
	β^b	IC 95%	p	β^b	IC 95%	p
As	-0.62	-0.18, 0.16	0.94	-0.60	-0.16, 0.15	0.94
Pb	-10.47	-0.49, 0.28	0.59	-13.63	-0.49, 0.22	0.46
Hg	-57.44	-2.1, 0.98	0.47	-85.28	-2.32, 0.61	0.25
Cd	60.68	0.14, 1.06	0.01*	62.97	0.21, 1.04	0.003*
Cr	-30.12	-0.60, 0.00	0.05	-25.90	-0.55, 0.03	0.08
Ni	0.11	-0.04, 0.04	0.96	-0.83	-0.05, 0.03	0.70
Ba	3.27	-0.30, 0.36	0.84	4.07	-0.27, 0.35	0.80
Co	2.31	-0.12, 0.16	0.75	11.72	-0.01, 0.25	0.09
Cu	4.40	-0.16, 0.24	0.67	7.48	-0.11, 0.26	0.77
Fe	-2.70	-0.10, 0.05	0.49	-3.62	-0.11, 0.03	0.34
Mn	143.37	-0.48, 3.34	0.14	109.98	-0.74, 2.94	0.24
Mo	0.97	-0.03, 0.05	0.69	3.29	-0.01, 0.07	0.16
Sr	1.42	-0.03, 0.05	0.54	2.82	-1.39, 7.05	0.19
Zn	0.18	-0.00, 0.00	0.24	0.21	-0.00, 0.00	0.15

β Coeficiente de regresión que expresa el cambio promedio en las unidades de las citocinas.

IC 95% Intervalo de confianza.

^a Ajustados por edad, genero y talla.

^b Los valores de β fueron multiplicados por 100.

*p \leq 0.05

Tabla 5. Asociación entre la concentración de los metales y los niveles plasmáticos de IL-4, en niños que viven en localidades de una zona minera del municipio de Taxco, Guerrero, México.

Metal (µg/l)	Niveles de IL-4 (pg/ml)					
	Modelo no ajustado			Modelo ajustado ^a		
	β ^b	IC 95%	p	β	IC 95%	p
As	-4.36	-0.14, 0.06	0.33	-5.79	-0.17, 0.05	0.32
Pb	-9.06	-0.32, 0.13	0.44	-8.86	-0.32, 0.14	0.46
Hg	30.12	-0.62, 1.24	0.51	47.78	-0.48, 1.44	0.33
Cd	5.66	-0.33, 0.44	0.77	8.92	-0.31, 0.47	0.65
Cr	-3.40	-0.28, 0.21	0.78	-10.55	-0.35, 0.14	0.40
Ni	-4.10	-0.07, -0.003	0.03*	-3.63	-0.06, 0.01	0.05*
Ba	-10.63	-0.36, 0.14	0.41	-11.15	-0.37, 0.14	0.40
Co	3.25	-0.07, 0.14	0.56	0.23	-0.11, 0.11	0.96
Cu	5.28	-0.10, 0.21	0.51	6.85	-0.08, 0.22	0.39
Fe	0.01	-0.06, 0.06	0.97	1.44	-0.05, 0.08	0.68
Mn	-91.73	- 2.4, 0.57	0.22	-64.97	-2.19, 0.89	0.40
Mo	2.45	-0.01, 0.06	0.18	3.01	-0.00, 0.07	0.12
Sr	1.25	-0.02, 0.04	0.48	1.17	-0.02, 0.04	0.51
Zn	-0.03	-0.00, 0.002	0.77	-0.06	-0.00, 0.001	0.58

β Coeficiente de regresión que expresa el cambio promedio en las unidades de las citocinas.

IC 95% Intervalo de confianza.

^a Ajustados por edad, género y talla.

^b Los valores de β fueron multiplicados por 100.

*p≤0.05

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los metales pesados como contaminantes ambientales han sido implicados en la inducción o exacerbación de disfunciones inmunológicas como alergias e inmunosupresión, asociado este último como un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer. Las citocinas han sido usadas como marcadores tempranos de alteraciones inmunológicas^[37,38].

Entre las poblaciones expuestas a ambientes contaminados, existen diferentes susceptibilidades^[43]. Los niños debidos a que presentan patrones de exposición y de susceptibilidad diferentes a los adultos, los hace recibir dosis de tóxicos ambientales más altas^[44]. En nuestro estudio, el total de niños presentaron concentraciones de Cr, Ni, Ba, Co y Mn en orina por encima de los valores de referencia y mas del 46%

tuvieron concentraciones en orina de Cd, Cu, As y de Pb en sangre también por arriba de los VR. Esto podría estar relacionado con lo reportado por Armienta *et al.*^[6] y Talavera *et al.*,^[5] quienes sugieren que los jales de Taxco, Guerrero, pueden ser fuentes de exposición a metales ya que el pH ácido que los caracteriza permite la liberación de iones metálicos como Fe, As, Mn, Cd, Cu y Pb; y que para As, Pb y Cd, superan los lineamientos para las aguas residuales de origen industrial^[46]; lo que da idea del grado de exposición crónica a la que se encuentran las poblaciones vecinas a estos jales. No se han determinado las concentraciones de metales como Ni, Ba y Co, en los jales o lixiviados de éstos, sin embargo, es probable su coexistencia con otros metales presentes, además de que la mineralogía de Taxco los reporta^[5]; o también es probable que puedan existir fuentes alternas de contaminación que aun no han sido identificadas.

El efecto del cadmio sobre los niveles promedio de IFN- γ en los niños, sugiere un incremento en la respuesta inmune celular por la exposición a este metal. Resultados similares a los nuestros han sido reportados previamente por Yucesoy *et al.*,^[51] en trabajadores expuestos a Cd (niveles en sangre $8.23 \pm 1.44 \mu\text{g/dl}$) y Pb (niveles en sangre de $5.352 \pm 3.19 \mu\text{g/dl}$). Otros estudios en modelos experimentales sugieren que el Cd afecta negativamente la respuesta inmune humoral al inhibir la proliferación de linfocitos B, la síntesis de IgE, a concentraciones de 1 a 10 μM en cultivos celulares^[52], sin embargo, se ha observado una respuesta inmunoestimuladora por la exposición a concentraciones mayores a 10 μM y la expresión de marcadores CD69, CD28 y CD23, implicados en respuestas inflamatorias al inducir la secreción de TNF- α e IFN- γ ^[53]. Aun cuando no se conocen con claridad los mecanismos de estos efectos, se sabe que el Cd al interactuar con receptores tipo hormonal, activa cascadas de señalización del trifosfato inositol (Ins(1,4,5)P₃/Ca²⁺) que provocan el incremento en la concentración gradual del Ca²⁺ libre intracelular; esto induce la activación por fosforilación de proteínas dependientes de Ca²⁺ como las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) responsables de fosforilar factores de transcripción^[54,55]. En este sentido, la producción de IFN- γ por células inmunológicas, responde a la señalización de IL-12, activándose MAP

cinastas como p38, responsables de fosforilar factores de transcripción como ATF-2 que participa en la regulación de la expresión del gen de IFN- γ ^[56]. Así es posible entonces, que el Cd permita la activación de p38 cinastas, lo que podría repercutir en un incremento en la respuesta de tipo Th1 y probablemente, como consecuencia, en el desarrollo de posibles padecimientos. Ramos *et al.*,^[57] han documentado la asociación significativamente positiva entre la prevalencia de enfermedades dermatológicas como dermatitis de contacto y dermatitis seborreica en población adulta, así como dermatitis atópica y xerosis en niños de 3 a 11 años de edad, en poblaciones rurales crónicamente expuestas a jales mineros, al compararlos con población no expuesta.

La disminución promedio de los niveles de IL-4 por efecto de la exposición a Ni encontrada en nuestro trabajo, sugiere una disminución de la respuesta humoral (Th2). Al respecto, otros estudios han reportado una mezcla de citocinas de tipo Th1/Th2 en cultivos de PBMC de pacientes alérgicos^[36,42]. Por otro lado, se han encontrado también linfocitos T con fenotipo CD4⁺ y CD8⁺ que responden a la exposición a Ni en personas alérgicas^[58].

Previos resultados de modelos experimentales, sugieren que los efectos inmunosupresores del Ni no afectan la vía interleucina 2/receptor soluble de IL-2 (IL-2/sIL-2R)^[59]. Además, se ha hipotetizado que el Ni estimula la respuesta tipo Th1 al actuar como hapteno^[60]. En ese sentido, se ha sugerido que en la presentación de péptidos, el Ni se une a una histidina del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) con genotipo preferencial HLA-DR (el IFN- γ es un fuerte inductor en la expresión de este genotipo), esta unión constituye un péptido antigénico haptenado, que activa la proliferación de células reactivas a Ni^[61,62]. Sinigaglia *et al.*,^[63] caracterizaron el perfil de citocinas que secretan células reactivas a Ni y encuentran que éstas sintetizan altos niveles de IL-2 e IFN- γ . Por otro lado Kapsenberg *et al.*,^[64] sugiere que el infiltrado celular en la epidermis de personas alérgicas a níquel se caracteriza por ser de tipo inflamatorio. Un estudio reciente de estimulación *in vitro* con Ni en cultivos de células PBMC provenientes de pacientes

alérgicos a este metal, encontraron una respuesta a nivel de proteína caracterizada por la producción de IFN- γ a diferencia de la producción de IL-10 encontrada en el grupo control^[65]. Los mecanismos de estas respuestas aun son desconocidos. Pero se ha documentado que el Ni provoca en células presentadoras un incremento en la fosforilación de las MAP cinasas p38 y ERK1/2, que estimula la liberación de TNF- α , citocina que es potencialmente inflamatoria^[66].

Un estudio complementario al nuestro, fue realizado por Moreno *et al.*,^[47] en células PBMC de esta misma población infantil de Taxco, Guerrero, al evaluar *in vitro* la expresión de RNAm de algunas citocinas, en condiciones basales y de estimulación con PHA, encontrando una asociación negativa del Pb con los niveles basales y estimulados de IFN- γ , así mismo del Pb y Cd con los niveles basales del RNAm de IL-12 y del As con el RNAm de IFN- γ en cultivos estimulados con PHA, sin encontrarse ningún efecto sobre el RNAm de IL-4. Estos resultados muestran la expresión *ex vivo* de los mensajeros de las citocinas al evaluar un posible efecto inmunomodulatorio. Mientras que en nuestro estudio, se evaluaron los niveles plasmáticos de dos citocinas representativas de la respuesta inmune que se encuentran *in vivo* bajo condiciones fisiológicas que solo son moduladas por los factores externos. En la evaluación de la asociación, la permanencia de la significancia estadística al hacer los ajustes, revelan la asociación atribuible a la exposición al metal y no a las variables cuyo efecto se substrajo. Luego entonces, la disminución de IL-4 asociado a los niveles de Ni podría explicarse como un evento secundario al incremento de IFN- γ asociado a la exposición a Cd, esto nos ofrece un panorama general de la regulación de las citocinas IFN- γ e IL-4 que modulan la respuesta Th1/Th2, siendo el IFN- γ un marcador potencial de inflamación que sugiere la presencia de una respuesta inflamatoria en esta población infantil. No obstante, estudios en un tamaño de muestra mas grande, la contribución de otras variables y el significado de otros biomarcadores sensibles y tempranos de daño subclínico, se requieren para establecer con mayor certeza estos hallazgos.

En conclusión, los hallazgos encontrados en este trabajo, mostraron un incremento del IFN- γ y una disminución de IL-4 por la exposición a Cd y Ni respectivamente, esto sugiere un desbalance de la respuesta inmune asociada a estos metales que podría favorecer la aparición de hipersensibilidad retardada en la población estudiada.

Referencias

1. Kim S, Kwon HJ, Cheong HK, Choi K, Jang JY, Jeong WC, *et al.* Investigation on health effects of an abandoned metal mine. *J Korean Med Sci* 2008; 23(3):452-8.
2. Lee SW, Lee BT, Kim JY, Lee JS. Human risk assessment for heavy metals and as contamination in the abandoned metal mine areas, Korea. *Environ Monit Assess* 2006;119(1-3):233-44.
3. Jasso-Pineda Y, Espinosa-Reyes G, González-Mille D, Razo-Soto I, Carrizales L, Torres-Dosal A, *et al.* An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integr Environ Assess Manag* 2007;3(3):344-50.
4. Hu H, Shine J, Wright RO. The challenge posed to children's health by mixtures of toxic waste: the tar creek superfund site as a case-study. *Pediatr Clin North Am* 2007;54(1):155-75.
5. Talavera-Mendoza O, Yta M, Moreno-Tovar R, Dotor-Almazán A, Flores-Mundo N, Duarte-Gutierrez C. Mineralogy and geochemistry of sulfide-bearing tailings from silver mines in the Taxco, Mexico area to evaluate their potential environmental impact. *Geof Inter* 2005;44(1):49-64.
6. Armienta-Hernández MA, Talavera-Mendoza O, Morton O, Barrera M. Geochemistry of metals from mine tailings in Taxco. México. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003;71(2):387-93.
7. Pineda-Zavaleta AP, García-Vargas G, Borja-Aburto VH, Acosta-Saavedra LC, Vera Aguilar E, Gómez-Muñoz A, *et al.* Nitric oxide and superoxide anion production in monocytes from children exposed to arsenic and lead in region lagunera, México. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198(3):283-90.
8. Mishra KP, Singh VK, Rani R, Yadav VS, Chandran V, Srivastava SP, *et al.* Effect of lead exposure on the immune response of some occupationally exposed individuals. *Toxicology* 2003;188(2-3):251-9.
9. Soto-Peña GA, Luna AL, Acosta-Saavedra L, Conde P, López-Carrillo L, Cebrián ME, *et al.* Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *FASEB J* 2006;20(6):779-81.
10. Chen WT, Hung WC, Kang WY, Huang YC, Chai CY. Urothelial carcinomas arising in arsenic-contaminated areas are associated with hypermethylation of the gene promoter of the death-associated protein kinase. *Histopathology* 2007;51(6):785-92.
11. Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *Int J Occup Environ Health* 2007;13(2):202-12.
12. McDonald C, Hoque R, Huda N, Cherry N. Risk of arsenic-related skin lesions in Bangladeshi villages at relatively low exposure: a report from Gonoshasthaya Kendra. *Bull World Health Organ* 2007;85(9):668-73.
13. Lindén C, Skare L, Nise G, Vahter M. Deposition of nickel, chromium, and cobalt on the skin in some occupations – assessment by acid wipe sampling. *Contact Dermatitis* 2008;58(6):347-54.
14. Silverberg NB, Licht J, Friedler S, Sethi S, Laude TA. Nickel contact hypersensitivity in children. *Pediatr Dermatol* 2002;19(2):110-3.

15. Ferreccio C, González C, Milosavjevic V, Marshall G, Sancha A, Smith A. Lung Cancer and Arsenic Concentrations in Drinking Water in Chile. *Epidemiology* 2000;12(6):673-9.
16. Bright P, Burge PS, O'Hickey SP, Gannon PF, Robertson AS, Boran A. Occupational asthma due to chrome and nickel electroplating Thorax 1997;52(1):28-32.
17. Malard V, Berenguer F, Prat O, Ruat S, Steinmetz G, Quemeneur E, *et al.* Global gene expression profiling in human lung cells exposed to cobalt. *BMC Genomics* 2007;6:8-147 doi:10.1186/1471-2164-8-147.
18. Park RM, Bena JF, Stayner LT, Smith RJ, Gibb HJ, Lees PS. Hexavalent chromium and lung cancer in the chromate industry: A Quantitative Risk Assessment. *Risk Anal* 2004;24(5):1099-108.
19. Li GY, Kim M, Kim JH, Lee MO, Chung JH, Lee BH. Gene expression profiling in human lung fibroblast following cadmium exposure. *Food Chem Toxicol* 2008;46(3):1131-7.
20. Asano S, Eto K, Kurisaki E, Gunji H, Hiraiwa K, Sato M, *et al.* Acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathol Int* 2000;50(3):169-74.
21. Calderón J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, Santos-Diaz MA, Golden A, Rodriguez-Leyva I, *et al.* Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res* 2001; 85(2):69-76.
22. Bellinger D. Lead neurotoxicity and socioeconomic status: Conceptual and analytical issues. *Neurotoxicology* 2008; 29(5):828-32.
23. Lucchini R, Cortesi I, Facco P, Benedetti L, Camerino D, Carta P, *et al.* Neurotoxic effect of exposure to low doses of mercury. *Med Lav* 2002;93(3):202-14.
24. Silva I, Graber J, Nyland J, Silbergeld E. In vitro HgCl₂ exposure of immune cells at different stages of maturation: effects on phenotype and function *Environ Res* 2005;98(3):341-8.
25. Lafuente A, González C, Esquifino AI. Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets. *Biometals* 2004;17(4):451-6.
26. Hemdan NY, Emmrich F, Faber S, Lehmann J, Sack U. Alterations of TH1/TH2 reactivity by heavy metals: possible consequences include induction of autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109(1):129-37.
27. Lutz PM, Wilson TJ, Ireland J, Jones AL, Gorman JS, Gale NL, Johnson JC, Hewett JE. Elevated immunoglobulin E (IgE) levels in children with exposure to environmental lead. *Toxicology* 1999;134(1):63-78.
28. Jelovcan S, Gutsch A, Barbara K, Sedlmayr P, Barth S, Marth E. Effects of low concentrations of cadmium on immunoglobulin E production by human B lymphocytes in vitro. *Toxicology* 2003;188(1):35-48.
29. Jadhav SH, Sarkar SN, Ram GC, Tripathi HC. Immunosuppressive effect of subchronic exposure to a mixture of eight heavy metals, found as groundwater contaminants in different areas of India, through drinking water in male rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007;53(3):450-8.
30. Colosio C, Birindelli S, Corsini E, Galli CL, Maroni M. Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207(2):320-8.

31. Hansen MB, Rydin S, Menné T, Duus Johansen J. Quantitative aspects of contact allergy to chromium and exposure to chrome-tanned leather. *Contact Dermatitis* 2002;47(3):127-34.
32. Gorrie MJ, Qasim FJ, Whittle CJ, Gillespie KM, Szeto CC, Nicoletti F, *et al.* Exogenous type-1 cytokines modulate mercury- induced hyper-IgE in the rat. *Clin Exp Immunol* 2000;121(1):17-22.
33. Conde P, Acosta-Saavedra LC, Goytia-Acevedo RC, Calderon-Aranda ES. Sodium arsenite-induced inhibition of cell proliferation is related to inhibition of IL-2 mRNA expression in mouse activated T cells. *Arch Toxicol* 2006; 81(4):251-9.
34. Lemarie A, Morzadec C, Bourdonnay E, Fardel O, Laurent V. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J immunol* 2006;177(1):3019-3017.
35. Hemdan N, Emmrich F, Adham K, Wichmann G, Lehmann I, El-Massry A, *et al.* Dose-Dependent Modulation of the In Vitro Cytokine Production of Human Immune Competent Cells by Lead Salts. *Toxicol Sci* 2005;86(1):75-83.
36. Minang J, Areström I, Troye M, Lundeberg L, Ahlberg N. Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin Exp Immunol* 2006;146(3):417-26.
37. Duramad P, Tager IB, Holland NT. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol Lett* 2007; 172(1-2):48-59.
38. Reinhild K, Schwenk M, Templeton D. Cytokine profiles in human exposure to metals. *Pure Appl Chem* 2006;78(11):2155-68
39. Galicia G, Leyva R, Tenorio EP, Ostrosky-Wegman P, Saavedra R. Sodium arsenite retards proliferation of PHA-activated T cells by delaying the production and secretion of IL-2 *Int Immunopharmacol* 2003;3(5):671-82.
40. Luna AL, Acosta-Saavedra L, Conde P, Vera E, Cruz MB, Gómez-Muñoz A, *et al.* Functional activity of Th1 and macrophages from children environmentally exposed to arsenic. *Toxicol Sci* 2003; 72(1):370-377.
41. Carey JB, Allshire A, van Pelt FN. Immune modulation by cadmium and lead in the acute reporter antigen-popliteal lymph node assay. *Toxicol Sci* 2006;91(1):113-22.
42. Minang JT, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlberg N. Nickel elicits concomitant and correlated in vitro production of Th1-, Th2-type and regulatory cytokines in subjects with contact allergy to nickel. *Scand J Immunol* 2005; 62(3):289-96.
43. Tamburlini G, von Ehrenstein OS, Bertollini R. Children's health and environment: a review of evidence. *Euro who int* 2002;29(1):1-269.
44. Goldman L, Falk H, Landrigan PJ, Balk SJ, Reigart JR, Etzel RA. Environmental pediatrics and its impact on government health policy. *Pediatrics* 2004; 113(4):1146-57.
45. Surkan PJ, Zhang A, Trachtenberg F, Daniel DB, McKinlay S, Bellinger DC. Neuropsychological function in children with blood lead levels <10 microg/dL. *Neurotoxicology* 2007;28(6):1170-7.

46. Talavera MO, Armienta HM, Abundis JG, Mundo NF. Geochemistry of leachates from the El Fraile sulfide tailings piles in Taxco, Guerrero, southern Mexico. *Environ Geochem Health* 2006;28(3):243-55.
47. Moreno M. Metal exposure in children from a mining site: Effects on RNA Expression of Th1 /Th2 Cytokines. En: Libro de Ponencias: 19 th Conference of the international society for environmental epidemiology (ISEE); 2007; México. Instituto Nacional de Salud Pública. 2007; 443-4.
48. Heitland P, Köster HD. Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clin Chim Acta* 2006; 365(1-2):310-8.
49. Wilhelm M, Schulz C, Schwenk M. Revised and new reference values for arsenic, cadmium, lead, and mercury in blood or urine of children: basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health* 2006;209(3):301-5.
50. Mills JE, Field CA, Dupuis DJ. Marginally specified generalized linear mixed models: a robust approach. *Biometrics* 2002;58(4):727-34.
51. Yücesoy B, Turhan A, Ure M, Imir T, Karakaya A. Effects of occupational lead and cadmium exposure on some immunoregulatory cytokine levels in man. *Toxicology* 1997;123(1-2):143-7.
52. Krocova Z, Macela A, Kroca M, Hernychova L. The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicol In Vitro* 2000;14(1):33-40.
53. Petanová J, Fucíková T, Bencko V, Sterzl I. The influence of metals on the expression of surface antigens on human lymphocytes in vitro. *Neuro Endocrinol Lett* 2006;1(1):46-8.
54. Benters J, Flögel U, Schäfer T, Leibfritz D, Hechtenberg S, Beyersmann D. Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using ¹⁹F-NMR spectroscopy. *Biochem J* 1997; 322(3):793-9.
55. Enslin H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ, Soderling TR. Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(20):10803-08.
56. Zhang S, Kaplan MH. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN- γ expression. *J Immunol* 2000; 165(3):1374-80.
57. Ramos W, Galarza C, Ronceros G, Amat F, Teran M, Pichardo L, *et al.* Noninfectious dermatological diseases associated with chronic exposure to mine tailings in a Peruvian district. *Br J Dermatol* 2008;159(1):169-74.
58. Traild C, Sebastiani S, Albanesi C, Merk HF, Puddu P, Girolomoni G, *et al.* Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes. *J Immunol* 2000;165(6):3058-64.
59. Theocharis S, Margeli A, Panayiotidis P. Effects of various metals on DNA synthesis and lymphokines production by human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Comp Biochem Physiol C* 1991;99(1-2):131-3.
60. Moulon C, Choleva Y, Hermann-Josef T, Wild D, Weltzien H. T cell receptor transfection shows non-HLA-restricted recognition of nickel by CD8 human T cells to be mediated by alpha bold beta T cell receptors. *J Invest Dermatol* 2003;121(1):496-501.
61. Thierse HJ, Moulon C, Allespach Y, Zimmermann B, Doetze A, Kuppig S, *et al.* Metal-Protein Complex-Mediated Transport and Delivery of Ni²⁺ to

- TCR/MHC Contac Sites in Nickel-Specific Human T Cell Activation. *J immunol* 2004; 172(3):1926-34.
62. Wang HM, Wang YQ, Ruan ZH, Fu XL, Xu WY, Zhao TT, Wu YZ. IFN-gamma promotes human monocytes to differentiate to untypical mature DC. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2008; 24(3):234-7.
63. Sinigaglia F, Scheidegger D, Garotta G, Scheper R, Pletscher M, Lanzavecchia A. Isolation and characterization of Ni-specific T cell clones from patients with Ni-contact dermatitis. *J Immunol* 1985;135(6):3929-32.
64. Kapsenberg ML, Res P, Bos JD, Schootemijer A, Teunissen MB, Van Schooten W. Nickel-specific T lymphocyte clones derived from allergic nickel-contact dermatitis lesions in man: heterogeneity based on requirement of dendritic antigen-presenting cell subsets. *Eur J Immunol* 1987;17(6):861-5.
65. Bordignon V, Palamara F, Cordiali-Fei P, Vento A, Aiello A, Picardo M, *Et al.* Nickel, palladium and rhodium induced IFN-gamma and IL-10 production as assessed by in vitro ELISpot-analysis in contact dermatitis patients. *BMC Immunol* 2008; 15(1):9-19.
66. Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, Suzuki H, Nishiyama N. Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄. *J Toxicol Sci* 2008; 33(1):51-9.