



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DEL VANADIO INHALADO EN EL MODELO
DE FIBROSIS HEPÁTICA POR CCl_4**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

GUMARO CANO GUTIÉRREZ

DIRECTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES

COMITÉ TUTOR: DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

MÉXICO, D.F.

Noviembre 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de mayo de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **CANO GUTIÉRREZ GUMARO** con número de cuenta **503005384** con la tesis titulada: **"EFECTO DEL VANADIO INHALADO EN EL MODELO DE FIBROSIS HEPÁTICA POR CCl₄."** realizada bajo la dirección de: **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT
Vocal: DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO
Secretario: DR. HÉCTOR RIVERO ROSAS
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Suplente: DR. JESÚS KAZOU YAMAMOTO FURUSHO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de octubre de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM y por el apoyo recibido por la beca otorgada por el CONACYT.

COMITÉ TUTORAL

Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Dr. Abel Santamaría del Ángel

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mí madre Rosa Martha Gutiérrez Sánchez

A mí padre Gumaro Cano Velasco

A mis hermanas Berenice, Verónica y Karen

A la Tte. M. en C. María Concepción Cano Rodríguez

A mis compañeros y maestros del Depto. de Biología Celular y Tisular

A la UNAM

DEDICATORIA

A mis padres, Rosa Martha Gutiérrez Sánchez y

Gumaro Cano Velasco:

“Si he podido desarrollar las fuerzas que la naturaleza me ha concedido y hacer buen uso de ellas, si he podido seguir el impulso de mi genio, trabajar y pensar... a ustedes se los debo a mí noble madre y padre, a sus actividades, a su prudencia, a su espíritu ahorrativo a su inquietud en el futuro. Sean benditos por haberme sostenido en este mundo, en el que sin ustedes, hubiese perecido mil veces...”

Su hijo Gumaro Cano Gutiérrez

ÍNDICE

1. Resumen.....	9
2. Abstract.....	12
3. Introducción.....	15
4. Antecedentes.....	17
4.1. Hígado.....	17
4.1.1. Estructura y función del hígado.....	17
4.1.2. Mortalidad por fibrosis hepática en México.....	25
4.2. Fibrosis hepática.....	27
4.2.1. Células estelares hepáticas y fibrosis hepática.....	29
4.3. Estrés oxidante y daño hepático.....	31
4.3.1. Daño por estrés nitrérgico y lipoperoxidación lipídica.....	33
4.4. Factor de crecimiento transformante beta 1 y fibrosis hepática.....	35
4.5. Daño hepático inducido por metales.....	37
4.6. Efecto del aire ambiental en el hígado.....	39
4.7. Modelo de daño y fibrosis hepática por CCl ₄	40
4.8. Pruebas de funcionamiento hepático.....	41
4.9. Evaluación de la biopsia hepática, índice de Knodell.....	43
4.10. Reversión de la fibrosis hepática.....	45
4.11. Vanadio.....	46
4.12. Metabolismo del vanadio.....	48

4.13.	Usos del vanadio.....	51
4.13.1.	Mecanismo de acción del vanadio.....	52
4.14.	Papel del vanadio como contaminante ambiental.....	53
4.15.	Niveles de vanadio en México.....	55
4.16.	Efectos del vanadio en la salud humana.....	56
4.17.	Efectos benéficos del vanadio.....	58
4.18.	Vanadio y fibrosis.....	60
4.19.	Papel del vanadio en el hígado.....	61
4.20.	Modelo de administración del vanadio por vía inhalada.....	62
5.	Planteamiento del problema.....	63
6.	Hipótesis.....	63
7.	Justificación.....	63
8.	Objetivos.....	64
9.	Material y Métodos.....	64
9.1.	Animales, vanadio y CCl ₄	64
9.2.	Obtención de tejidos.....	65
9.3.	Evaluación histológica, índice de Knodell.....	66
9.4.	Determinación de las Pruebas de Función Hepática (PFH).....	67
9.5.	Determinación por inmunohistoquímica de nitrotirosina, 4 hidroxinonenal y alfa actina de músculo liso.....	68
9.7.	Extracción y electroforesis de proteínas totales.....	68

9.8. Western Blot.....	69
9.9. Análisis estadístico.....	69
10. Resultados.....	70
10.1. Evaluación histológica e índice de Knodell.....	70
10.2. Pruebas de Funcionamiento Hepáticas.....	78
10.3. Determinación de daño por estrés nitrérgico y lipoperoxidación hepática....	81
10.4. Células estelares hepáticas.....	86
10.5. Determinación del contenido de Factor de Crecimiento Transformante beta 1.....	88
11. Discusión.....	90
12. Conclusiones.....	97
13. Perspectivas.....	97
14. Referencias.....	98
15. Artículo derivado del trabajo experimental.....	102

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

HE: Hematoxilina-eosina

HRP: Peroxidasa de rábano

IARC: Agencia Internacional para la investigación del Cáncer

IHC: Inmunohistoquímica

IL: Interleucina

TBS: Solución amortiguadora de Tris

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1

V: Vanadio

CCl₄: Tetracloruro de carbono

4-HNE: 4-Hidroxinonenal

WB: Western blot

1. RESUMEN

Introducción

La fibrosis hepática es el resultado final de la mayoría de las enfermedades hepáticas y un problema de salud pública. Se caracteriza por un depósito excesivo de matriz extracelular en el parénquima hepático, que conlleva a la pérdida de la función hepática y la muerte del individuo.

Son varios los factores que intervienen en esta enfermedad, uno de ellos es el efecto que tienen los metales que respiramos en el aire, como el vanadio, este es un metal de transición, utilizado como suplemento deportivo, tiene efectos hipoglucemiantes en modelos experimentales de diabetes mellitus. El vanadio es un micronutriente esencial en algunos organismos, pero en los humanos aún no se ha demostrado.

En el hígado se han descrito efectos duales, que van a depender de la concentración y tipo de compuesto, por un lado el vanadio induce lipoperoxidación hepática al actuar como prooxidante durante la reacción de Fenton y por otro lado, limita el daño hepático en modelos de hepatocarcinoma al disminuir la proliferación celular y el tamaño de los mismos.

Debido a estas propiedades, el objetivo de nuestro estudio fue investigar los efectos del vanadio por vía inhalada en el daño y la progresión en un modelo de fibrosis hepática inducida por el tetracloruro de carbono (CCl_4) en ratones.

Método

Se utilizaron 40 ratones CD-1, divididos en 4 grupos: grupo control, grupo expuesto a V_2O_5 , grupo tratado con CCl_4 y grupo tratado con CCl_4 y V_2O_5 . El grupo control se trató con el vehículo durante 6 semanas; la exposición al V_2O_5 se realizó a una concentración de 0.02 M dos veces a la semana por 1 h durante 6 semanas, en un ultranebulizador (UltraNeb 99 De Vilbis). El tratamiento con CCl_4 se aplicó vía intraperitoneal a una dosis de 0.4 g/kg, 2 veces a la semana durante 6 semanas y en el grupo tratado con la mezcla, se realizaron los 2 procedimientos antes descritos durante 6 semanas.

Después de la exposición se sacrificaron los ratones del grupo control y los grupos expuestos, para evaluar los cambios. Se les realizó tinción de hematoxilina y eosina (H/E) y Masson. El daño hepático se evaluó de acuerdo a la escala de lesiones de Knodell. Las determinaciones de las pruebas de función hepáticas (PFH) se realizaron en el suero de los ratones.

Se realizó inmunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso, nitrotirosina y 4 hidroxinonenal. Por último, western blot para TGF- β 1. Los resultados obtenidos se compararon mediante una ANOVA y se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

Resultados.

Los cambios histológicos en el grupo expuesto a vanadio y la mezcla se caracterizaron por la presencia de meganúcleos y binucleación en los hepatocitos con respecto al grupo expuesto a CCl_4 y al control ($p < 0.05$). En el grupo tratado con CCl_4 se observó necrosis y degeneración intralobulillar ($p < 0.05$), respecto al grupo tratado con vanadio y la mezcla. La

fibrosis hepática fue significativa en el grupo expuesto a CCl₄ (p<0.05), con respecto al grupo expuesto a vanadio y al grupo expuesto a vanadio y CCl₄. En las PFH, ALT y AST su concentración fue más alta en el suero del grupo expuesto a CCl₄ (p<0.05), que en el grupo expuesto a vanadio y al grupo expuesto a vanadio y CCl₄, ya que estas fueron menores, pero se encontraron elevadas comparadas con el grupo control (p<0.05). La presencia de células estelares identificadas por alfa actina de músculo liso, fue menor en el grupo expuesto a vanadio y al grupo expuesto a vanadio y CCl₄ (p<0.05), con respecto al grupo tratado con CCl₄. La presencia del 4 hidroxinonenal y la nitrotirosina fue menor con respecto al grupo tratado con CCl₄ (p<0.05). El western blot para TGF-β1 fue significativamente menor (p<0.05) en los grupos expuestos a vanadio y al grupo expuesto a vanadio y CCl₄, con respecto al grupo tratado con CCl₄.

Conclusiones.

El vanadio reduce el daño hepático y la fibrosis inducida por el CCl₄.

El vanadio induce la presencia de meganúcleos hepáticos, que son una respuesta a una mayor demanda metabólica por parte del hígado.

Los meganúcleos hepáticos indican un estado de hipertrofia y regeneración hepática.

La presencia de meganúcleos en los hepatocitos no progresó a una neoplasia hepática al menos en 6 semanas.

2. ABSTRACT

Introduction

Liver fibrosis is the end result of most liver diseases and corresponds to an unsolved public health problem. Therefore it is necessary to know several of the factors involved in this disease, as are the metals found in the air we breathe, particularly vanadium and its effect on the development and progression of liver fibrosis.

Liver fibrosis is characterized by excessive deposition of extracellular matrix in the liver parenchyma leading to loss of liver function and death of the individual.

Vanadium is a transition metal that is used as sports supplement has also been shown to have hypoglycemic effects in experimental models of diabetes mellitus. Vanadium is an essential micronutrient in some organisms, but this has not been proven yet in humans and many of its potential therapeutic effects are still under evaluation. With respect to the liver have been reported dual effects that will depend on the concentration and type of compound. On one hand, the vanadium induces hepatic lipid peroxidation by acting as a prooxidant during the Fenton reaction. On the other hand has shown to limit the liver damage in models of liver cancer by decreasing cell proliferation and decrease tumor size. Because of these properties, the aim of our study is to investigate the effects of inhaled vanadium in liver damage and fibrosis progression induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in mice.

Methods

We used 40 CD-1 mice were divided into 4 groups in a control group, exposed to V_2O_5 , group treated with CCl_4 and CCl_4 plus V_2O_5 treated group.

V_2O_5 exposure was performed at a concentration of 0.02 M, twice a week for 1 h for 6 weeks. CCl_4 treatment was applied intraperitoneal at a dose of 0.4 g / kg, 2 times a week for 6 weeks. In the group treated with the mixture, the 2 procedures were performed as described above for 6 weeks. The control group was treated with the vehicle for 6 weeks. After exposure, the control group and exposed groups were sacrificed at 6 weeks to assess changes. Livers were stained H/E and Masson: Liver damage was assessed according to Knodell scale injury. Determination of liver function tests (LFT) values in the mice serum. We performed immunohistochemistry for alpha smooth actin, nitrotyrosine and 4 hydroxynonenal. Finally, the test was performed by western blot for TGF- β 1. The results were compared using ANOVA and a $p < 0.05$ was considered as significant.

Results

Histological changes in the group exposed to the mixture is characterized by the presence of meganúcleos and binucleation in hepatocytes with respect to the exposed group with CCl_4 and the control ($p < 0.05$). Similarly, the group was exposed to vanadium binucleation, meganucleus and liver with respect to the control group ($p < 0.05$). Group treated with CCl_4 was observed intralobular necrosis and degeneration ($p < 0.05$) for group treated with vanadium and mixing. Liver fibrosis was significant in the group exposed to CCl_4 ($p < 0.05$) compared with the group exposed to vanadium and mixing. In the LFT, ALT and AST concentration was higher in serum in the group exposed

to CCl₄ (p<0.05) and these were lower in the exposed group with vanadium and mixing, but there were high compared with the control group (p<0.05).

The presence of stellate cells identified by alpha smooth muscle actin was lower in the group exposed to vanadium and in the mixture (p<0.05) compared to the treated group with CCl₄. Likewise the presence of 4 hydroxynonenal and nitrotyrosine was lower compared to CCl₄ treated group (p <0.05). The western blot for TGF-β 1 was significantly lower (p <0.05) in groups exposed to vanadium and the mixture compared with the group treated with CCl₄.

Conclusions

Vanadium reduces liver injury and fibrosis induced by CCl₄, the protective effect may be due to the vanadium antagonism on the effect of CCl₄ when it was co-administrated. Also that vanadium induces the presence of meganucleus and binucleation in hepatocytes that indicate an adaptative response of detoxification for the liver damage.

3. INTRODUCCIÓN

Tanto las enfermedades crónicas del hígado, la fibrosis hepática y su resultado final la cirrosis hepática, ocupan los primeros lugares como causa de muerte en población masculina adulta en México y en el mundo ¹. Esta situación las ubica como un problema de salud pública, que va de la mano con las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Además, el hígado es el órgano más solicitado para trasplante, después del riñón y la cornea, de acuerdo al Registro Nacional de Trasplantes¹⁻².

Las causas del daño hepático son variadas, entre las que encontramos la ingesta de alcohol, infecciones por hepatitis crónica por virus B y C, enfermedades autoinmunitarias y la obstrucción de los conductos biliares³.

El daño y la fibrosis hepática es el resultado de las agresiones al parénquima hepático, caracterizada por ser una enfermedad progresiva y letal que provoca en el hígado una reacción inflamatoria, alterando su función metabólica y circulatoria³⁻⁴. Al llegar a estadios avanzados el daño es irreversible y las células del parénquima hepático sustituyen el tejido hepático por tejido fibrótico o cicatrizal, lo que lleva a una pérdida de la función hepática⁴.

Por otro lado, el tratamiento depende del grado de fibrosis en el que se encuentre la glándula hepática, ya que en etapas tempranas si se retira el agente causal el hígado puede recuperarse íntegramente⁵. Pero en la mayoría de las veces, esto es difícil de lograrlo, ya que a la mayoría de las personas se les diagnostica la enfermedad en estadios terminales, debido a que los síntomas por daño hepático tardan en aparecer y se manifiestan una vez que el hígado se encuentra en un estado de fibrosis hepática avanzado⁵.

Son varias las estrategias empleadas para disminuir o eliminar la progresión de la fibrosis hepática. Una de estas estrategias es incrementar la respuesta de defensa y desintoxicación por parte del hepatocito. Se ha demostrado que la administración de vanadio en modelos experimentales de cáncer hepático⁶⁻¹⁰ mejora la respuesta de la glándula hepática. Por lo que nosotros proponemos que el vanadio disminuye la fibrosis hepática inducida experimentalmente por CCl₄.

4. Antecedentes

4.1. Hígado

4.1.1. Estructura y función del hígado

El hígado es la glándula más grande del organismo, se localiza en el hipocondrio derecho del abdomen y protegido por la parrilla costal. Tiene un peso aproximado de 1400 g a 1600 g³. Está cubierto por una capa de tejido conjuntivo denominado cápsula de Glisson y ésta a su vez está recubierta de peritoneo. Tiene un hilio hepático en el que ingresa la vena porta, la arteria hepática y emerge el conducto hepático común, que drena en la vesícula biliar⁴, figura 1.

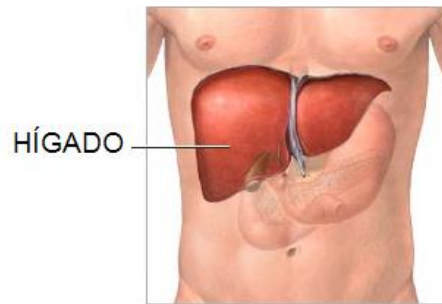


Figura 1. Localización y forma macroscópica de la glándula hepática. Se aprecia la localización anatómica del hígado, en la parte derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma y por encima del estómago.

La irrigación sanguínea es característica de esta glándula, ya que recibe sangre oxigenada y sangre venosa. La sangre oxigenada proviene de la arteria hepática derecha e izquierda (aporta el 25%) y la sangre venosa de la vena porta que proviene del intestino delgado

(aporta el 75%). Ambos vasos sanguíneos ingresan al hígado por el hilio hepático y originan numerosas ramas que se distribuyen en el parénquima hepático³.

El estroma o el armazón del hígado inicia desde la cápsula de Glisson y está constituido por tejido conjuntivo, de la cual se desprenden hacia el interior del parénquima hepático trabéculas conjuntivas (fibras colágenas y reticulares), las cuales rodean a los componentes celulares, formados por hepatocitos⁴.

El sustento conjuntivo de los hepatocitos en el interior de los lobulillos hepáticos es una red tridimensional de fibras reticulares (colágena tipo IV). En el interior del parénquima hepático el tejido conjuntivo rodea una unidad tisular, formada por las ramas más delgadas de las estructuras mencionadas, que se sitúan en los vértices de los lobulillos hepáticos para constituir las triadas portales y se encuentran los espacios de Kiernan o espacios portales¹¹.

El parénquima hepático está formado por los hepatocitos dispuestos en cordones y luego en lobulillos hepáticos. Representan alrededor del 80% del parénquima hepático, presentan varias superficies que se orientan hacia dos microambientes, uno en contacto con hepatocitos vecinos y otro hacia un espacio perivascular, llamado también el espacio de Disse³.

El hepatocito es la célula funcional del hígado. Los hepatocitos se organizan tridimensionalmente en forma de cordones, placas o muros de trayecto irregular, que se anastomosan entre sí. Entre ellos se localizan capilares sanguíneos sinusoidales, con los cuales los hepatocitos intercambian productos⁴ (Figura 2).

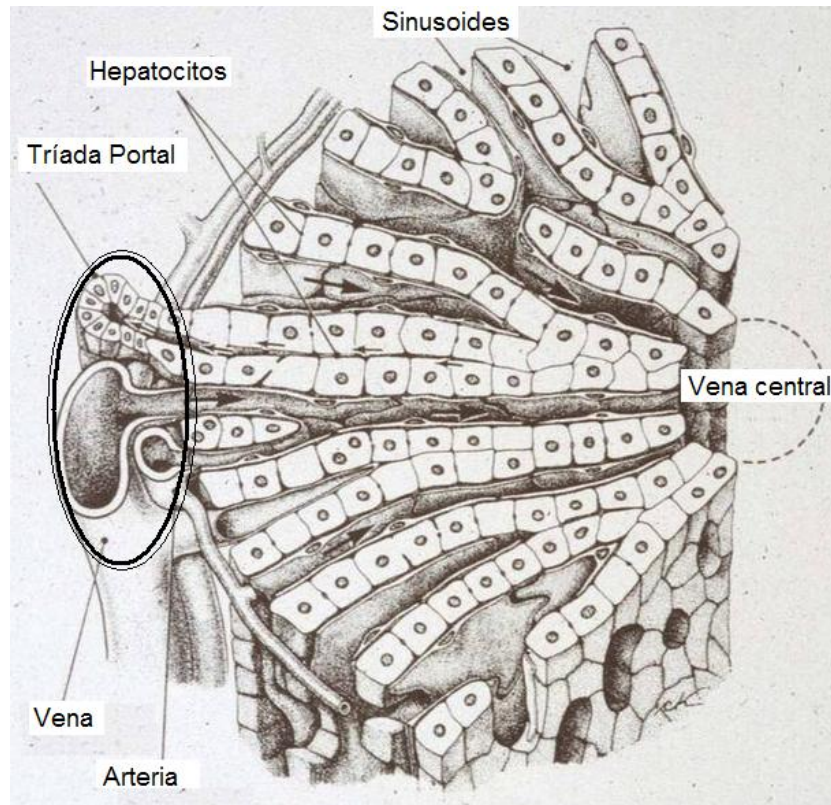


Figura 2. Representación de la histología hepática. Se observa la arquitectura histológica del parénquima hepático, se muestran las células hepáticas, el espacio sinusoidal, la triada portal y la localización de la vena central. Tomado de Histology. A text and atlas. With Cell and Molecular Biology, 4th edition, 2005.

Los hepatocitos son células de núcleos voluminosos y esféricos, con una distinción muy clara de la cromatina y de los nucléolos. El hepatocito es la célula funcional del hígado. Es una célula poliédrica o poligonal, de dimensiones de 20-30 micras, se le describen 6 caras, aunque puede tener más, dos caras o superficies que miran al espacio de Disse, en esta superficie poseen microvellosidades lo que incrementa la extensión de superficie disponible para el intercambio de sustancias entre el hepatocito y plasma. Las otras caras laterales están en contacto con otros hepatocitos, algunos hepatocitos suelen poseer dos núcleos. Un

50% de hepatocitos son poliploides y tienen doble cantidad DNA. Su vida media es de 5 meses y tienen la capacidad de regenerarse ante la exposición de toxinas, enfermedad o resección quirúrgica¹².

El citoplasma del hepatocito muestra zonas de basofilia (presencia de retículo endoplásmico rugoso y polirribosomas libres) y de acidofilia (abundancia de acumulaciones de glucógeno y de retículo endoplásmico liso). Se observan numerosas mitocondrias y varios dictiosomas, cisternas del aparato de Golgi, de posición perinuclear, también contienen algunas gotitas de grasa y numerosos lisosomas.

Con respecto a la organización del parénquima hepático se han propuesto las siguientes descripciones: el lobulillo hepático clásico, el lobulillo portal y el acino hepático (Figura 3).

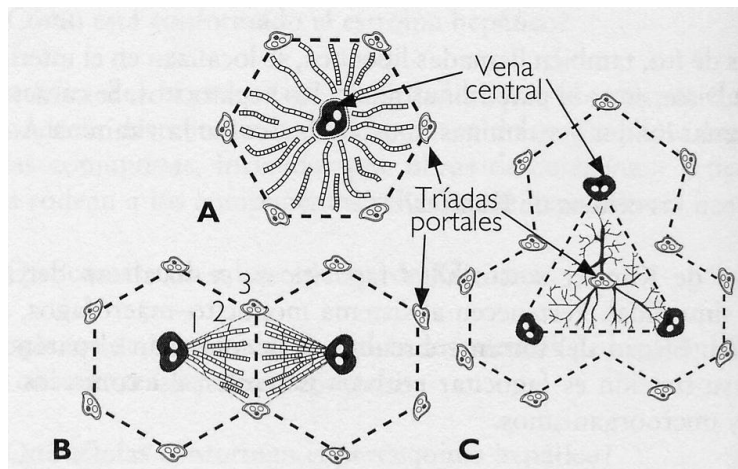


Figura 3. Descripción de la representación anatómica, biliar y funcional del hígado. (a) Lobulillo hepático. (b) Lóbulo portal. (c) Acino hepático o lóbulo de Rappaport. Tomado de Biología Celular e Histología Medica, primera edición. 2010.

El lobulillo hepático: Los hepatocitos se disponen en placas o muros separados entre sí por capilares sinusoidales, alrededor de la vena centrolobulillar de la cual irradian hacia el exterior para ser rodeados por las finas trabéculas de tejido conjuntivo. Adquieren la forma de un hexágono, cuyas dimensiones son de unos 2 milímetros de longitud por 1 milímetro de diámetro. Al observarse en secciones transversales exhiben contornos hexagonales de tamaños variables. Esta disposición poligonal se observa con nitidez en el hígado de cerdo, en cambio en los humanos u otros mamíferos esta disposición de tejido conjuntivo no es muy notoria. En cada arista del prisma hepático (lobulillo hepático clásico) se localiza una triada hepática.

Lobulillo portal: El lobulillo portal enfatiza la función exócrina del hígado. Es una unidad funcional que se centra alrededor del conducto biliar. Se define como un área triangular compuesta por el parénquima de tres lobulillos hepáticos adyacentes, cuyos vértices son las venas centrales.

El acino hepático: También conocido como lóbulo de Rappaport. Está constituido por porciones del parénquima hepático de forma romboidal, comprendido entre dos venas centrolobulillares y dos triadas portales. Los diversos componentes del parénquima hepático dispuestos de esta manera explican las diversas acciones que se efectúan por el aporte de sustancias a través de la irrigación sanguínea. En el acino hepático se dividen tres zonas, de acuerdo al grado de perfusión vascular y actividad metabólica:

Zona 1, son los hepatocitos periportales (hepatocitos periféricos al acino) o hepatocitos cercanos a las triadas portales, considerada la zona más oxigenada, la más cercana al eje.

Es la primera en recibir oxígeno, nutrientes y toxinas. Estas células son las últimas en morir y las primeras en regenerarse.

Zona 2, no tiene límites bien definidos es la porción central o intermedio del acino.

Zona 3, es la más cercana a la vena centrolobulillar, es menos rica en nutrientes y oxígeno. Se encuentra con mayor frecuencia en el sistema biliar. En caso de hipoxia esta zona sufre necrosis e isquemia ya que tiene menos oxígeno y es más susceptible al daño.

Otras células del hígado son las células de Kupffer y los lipocitos ó células de Ito. Las células de Kupffer constituyen el sistema fagocítico mononuclear. Estas células derivan de los monocitos y pertenecen al sistema monocito-macrófagos, pues derivan de estas células; a través del torrente circulatorio arriban al órgano y colonizan el parénquima hepático, situándose en la superficie o en los lugares de reunión de los capilares sinusoidales. Fagocitan eritrocitos seniles, así como restos celulares y algunos microorganismos. Las células de Kupffer se encuentran en la superficie del endotelio en la luz del sinusoides y no están unidas al endotelio vecino. Estas pueden ocluir parcialmente la luz del sinusoides³.

Los lipocitos ó células de Ito. También llamadas células estelares hepáticas se localizan en el interior del espacio de Disse (espacio comprendido entre la pared sinusoidal y los hepatocitos), tienen prolongaciones que rodean a los capilares sinusoidales. Se considera que a través de sus prolongaciones citoplasmáticas (poseen en su interior filamentos de actina) pueden regular el flujo sanguíneo que discurre en el interior de los sinusoides. La célula de Ito, lipocito perisinusoidal o célula estelar hepática son el principal sitio de almacenaje de vitamina A, esta es almacenada en forma de esteres de retinol, en inclusiones lipídicas citoplasmáticas, cuando se libera lo hace en forma de retinol (la forma alcohólica).

Es transportada del hígado a la retina, donde se une a la proteína opsina para formar rodopsina, el pigmento visual de los bastones retinianos.

En la inflamación del parénquima hepático, la célula estelar hepática responde perdiendo la capacidad de almacenar vitamina A y las células estelares sufren un proceso denominado “activación”, en el cual se transforman a una forma celular parecida al miofibroblasto, esta forma celular es capaz de alterar la matriz extracelular hepática¹³.

FUNCIÓN HEPÁTICA

Una de las funciones del hígado es las de degradar fármacos y biomoléculas extrañas que ingresan al organismo, el hígado convierte estas moléculas más solubles en el agua para que sean eliminadas por el riñón. Esto lo realiza en dos fases, la primera llamada fase de oxidación y la segunda fase de conjugación, en la que participa el citocromo P₄₅₀ 2E1 (CYP2E1), involucrada en la producción de radicales libres.

Además, en el hígado se almacenan varios nutrientes como vitaminas, entre las que se encuentran:

- La vitamina A (retinol) es importante para la visión. Su precursor es el retinol del cual se obtienen la rodopsina, un pigmento visual para los bastones retinianos. Se almacena en las células de Ito, en caso de déficit el hígado moviliza sus reservas liberando el retinol a través de estas células. Al haber un déficit de esta vitamina, el individuo cursa con ceguera nocturna y trastornos de la piel.

- La vitamina D (calciferol), es importante en el metabolismo de calcio y fosfato. Se adquiere a través de la dieta y de la piel expuesta a luz ultravioleta. Es necesaria para el desarrollo y crecimiento del esqueleto y dientes. En la deficiencia de ésta vitamina se presenta raquitismo en niños y osteomalacia en adultos.

- La vitamina K (filoquinona). Su origen es la dieta y la síntesis de la flora bacteriana del intestino delgado. Se requiere para que el hígado produzca los factores que necesita la sangre para coagular apropiadamente, entre los que se incluyen el factor II (protrombina), factor VII (proconvertina), factor IX (componente de la tromboplastina) y factor X (el factor de Stuart). La deficiencia de vitamina K o alteraciones en la función hepática (por ejemplo, una insuficiencia hepática grave) pueden conducir a deficiencias de los factores de coagulación que conduce al sangrado excesivo.

El hígado también regula otras vías metabólicas, entre las que se incluyen el metabolismo de carbohidratos, glucosa, lípidos y colesterol, de este último se forman las sales biliares, así como la síntesis de urea a partir de iones de amonio, producto de la degradación de proteínas y ácidos nucleicos.

4.1.2. Mortalidad por fibrosis hepática en México

La muerte por enfermedades hepáticas es un problema de salud pública en México, ya que ocupa los primeros lugares de mortalidad en mujeres y hombres⁴, (tabla 1). Este padecimiento constituye una de las 10 principales causas de hospitalización en las instituciones de salud, con una elevada tasa de mortalidad (20.3 defunciones por 100 000 habitantes).

En México se utiliza el indicador de mortalidad por cirrosis hepática y este se define como el riesgo de morir a causa de la cirrosis hepática en una población, en un periodo determinado.

Fórmula:

$$\frac{\text{Número total de defunciones debidas a cirrosis hepática
En una población y un periodo determinado}}{\text{Total de población, en esa población y periodo determinado}} \times 100,000$$

Este indicador se constituye como un instrumento de vigilancia y evaluación epidemiológica, que mide la magnitud de las defunciones por cirrosis hepática en una población, en un periodo determinado. La cirrosis hepática está asociada con el incremento en la incidencia de la hepatitis B y C, y con la enfermedad alcohólica, motivo por el cual es necesaria su evaluación permanente⁴.

Tabla 1. Tabla de mortalidad en México. Se muestran las causas de mortalidad en México en hombres y mujeres. Se observa que las muertes por enfermedades hepáticas ocupan el quinto lugar.

Causas de defunción

Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2008

Principales causas	Defunciones
Total	539 530
Enfermedades del corazón ^a	92 679
Enfermedades isquémicas del corazón	59 801
Diabetes mellitus	75 637
Tumores malignos	67 048
Accidentes	38 875
De tráfico de vehículos de motor	17 058
Enfermedades del hígado	31 528
Enfermedad alcohólica del hígado	13 361
Enfermedades cerebrovasculares	30 246
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	16 540
Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal ^b	14 768
Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el periodo perinatal	6 829
Agresiones	14 006
Influenza y neumonía	13 456
Insuficiencia renal	11 202
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	8 946
Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	8 354
Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	5 678
Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana	5 189
Lesiones autoinfligidas intencionalmente	4 681
Septicemia	4 393
Anemias	3 591
Enfermedades infecciosas intestinales	3 574
Úlceras gástricas y duodenal	2 604
Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio, no clasificados en otra parte	10 529
Las demás causas	76 006

Nota: Si desea obtener más información acerca de las principales causas de mortalidad por entidad federativa, edad y sexo, se sugiere consultar el tabulado **Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido**, donde podrá generar de manera dinámica la combinación de variables de su preferencia, con datos de periodos anteriores.

^a Se excluye paro cardíaco.

^b Incluye tétanos neonatal.

Fuente: INEGI. *Estadísticas de Mortalidad*.

Fecha de actualización: Miércoles 21 de abril de 2010

La mayor parte de los pacientes con enfermedad hepática crónica tienen antecedentes familiares de alcoholismo. La distribución de la ingesta de alcohol es independiente de la ocupación y del grado de escolaridad. En la mayoría de los casos en los enfermos crónicos hepáticos, transcurre un año después de que inicia la sintomatología para que se establezca el diagnóstico. Este hecho tiene gran importancia, ya que la suspensión del alcohol en las fases iniciales puede disminuir las complicaciones y progresión de la fibrosis hepática, además de contribuir a prolongar la vida de los pacientes. El retraso en el diagnóstico se debe en parte al desconocimiento de las manifestaciones de la enfermedad por la población en general².

4.2. Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es el resultado de un daño crónico en el hígado y se caracteriza por la acumulación de proteínas de matriz extracelular, que sustituyen al parénquima hepático. Las principales causas de la fibrosis hepática es la infección crónica por el virus de la hepatitis C, el abuso de la ingesta de alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica³.

La acumulación del tejido cicatrizal en el parénquima hepático altera la arquitectura por medio de una cicatriz fibrosa, con el posterior desarrollo de nódulos de regeneración hepática carentes de vena central y esto último es a lo que se define como cirrosis hepática. Esta condición induce la disfunción hepatocelular y el aumento de la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo, que da lugar a una insuficiencia hepática e hipertensión portal³⁻⁴.

Se creía históricamente que la fibrosis hepática era un proceso pasivo e irreversible, debido a la pérdida del parénquima hepático y su sustitución con tejido cicatrizal, rico en colágeno. En la actualidad, se considera que la fibrosis hepática es un estadio reversible de la enfermedad³¹.

Las células estelares hepáticas, anteriormente conocidos como lipocitos, células de Ito o células perisinusoidales, fueron identificadas como las fuentes de producción del colágeno y de la cicatriz hepática¹⁴. Este tipo de células se describieron por primera vez por von Kupffer en 1876, que identificó al observar el cambio de fenotipo al activarse las células estelares en las enfermedades crónicas del hígado y que adquirirían propiedades fibrogénicas. Los métodos para la obtención de las células estelares hepáticas se estandarizaron a partir de 1980 y el cultivo de estas en placas de plástico, se aceptó como un modelo para el estudio de las células estelares hepáticas¹³.

Se han desarrollado modelos experimentales de estudio para la fibrosis hepática en ratas y ratones transgénicos, lo que corroboró los resultados obtenidos en los medios de cultivo y se identificaron a las células estelares como principales mediadores fibrogénicos^{13,15}. A nivel clínico, la historia natural de la fibrosis hepática se describió en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C, se identificaron factores fibrosadores lentos y rápidos, como son la ingesta de alcohol, factores genéticos que influyen parcialmente en el desarrollo de la fibrosis hepática¹⁶.

4.2.1. Células estelares hepáticas y fibrosis hepática

Las células estelares hepáticas son células no parenquimatosas del hígado, en estado de reposo sus funciones son el almacenamiento de vitamina A y ayudan a mantener la membrana basal. Se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*, que las células estelares hepáticas tienen la capacidad de cambiar su fenotipo al recibir estímulos externos de daño hepático¹⁷. En estado de activación, pierden su contenido de vitamina A, empiezan a proliferar y cambian a un fenotipo tipo miofibroblasto, además de sintetizar una matriz rica en colágeno tipo I y por último adquieren propiedades contráctiles y proinflamatorias¹⁸ (Figura 4).

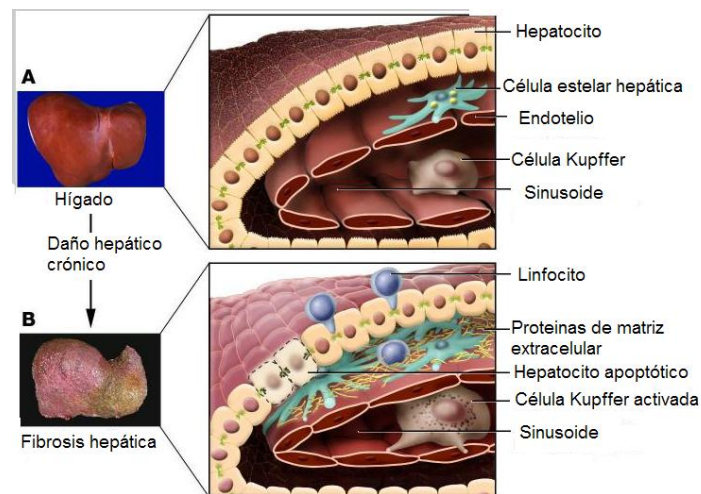


Figura 4. Cambios en la arquitectura del hígado por fibrosis hepática. (A) Hígado sano con estructura histológica normal. (B). Se muestra una lesión crónica en hígado, infiltrado inflamatorio, hepatocitos en apoptosis, células estelares activadas, liberación de mediadores fibrogénicos. La contracción por parte de las células estelares contribuye a un aumento en la resistencia en el flujo sanguíneo del sinusoide hepático, figura tomada de Bataller R, Brenner DA. J Clin Invest 2005;115:209-18.

Las células estelares migran y se acumulan en los sitios de daño y reparación del tejido hepático. Es importante mencionar que las células estelares en reposo expresan una serie de marcadores neuroendocrinos, en cambio las células estelares activadas expresan marcadores miogénicos como la alfa-actina de músculo liso, que sirve para identificar su activación por inmunohistoquímica¹⁹, figura 5.

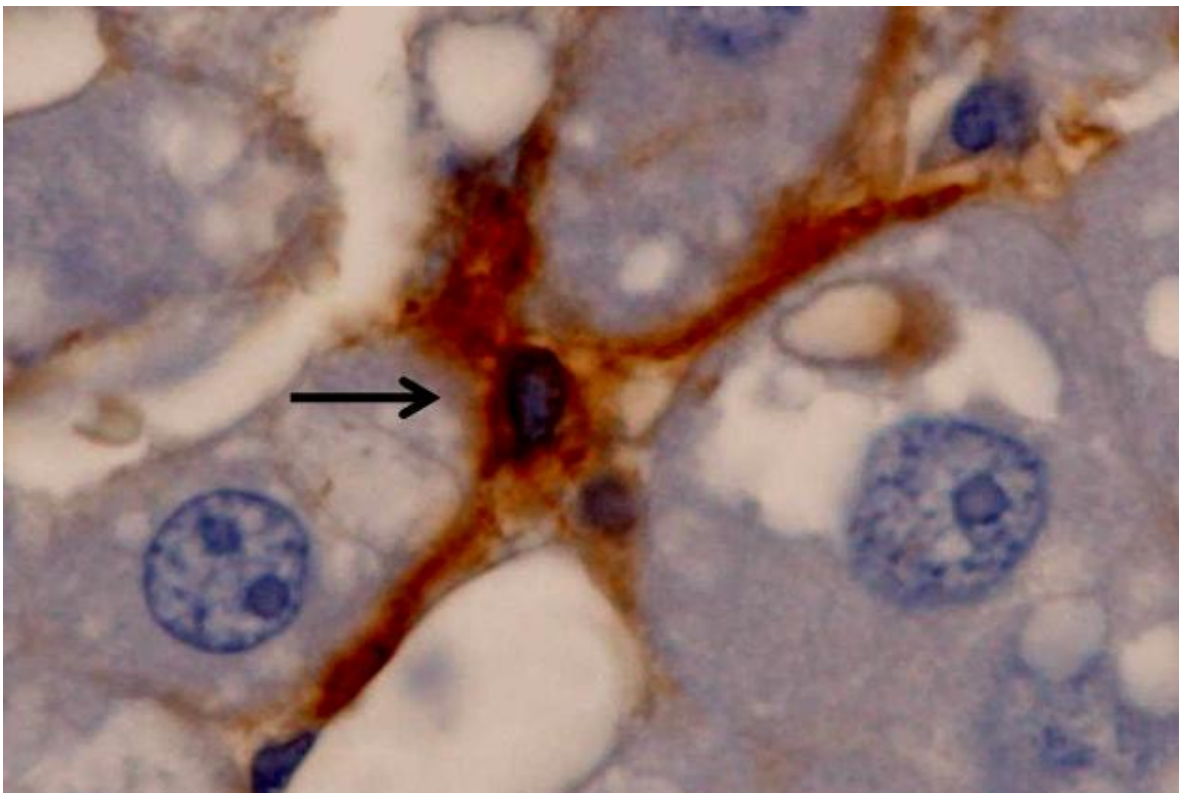


Figura 5. Célula estelar hepática identificada por inmunohistoquímica. Se representa una célula estelar hepática con alfa-actina de músculo liso, en el espacio de Disse. Se indica con una flecha. Aumento 100x.

Los hepatocitos al ser lesionados por la mayoría de los agentes hepatotóxicos como los virus hepatotrópicos, los metabolitos del alcohol y los ácidos biliares, generan como respuesta especies reactivas de oxígeno y mediadores fibrogénicos que inducen el reclutamiento de células inflamatorias. Asimismo, la apoptosis de los hepatocitos dañados estimula a los miofibroblastos a la producción de mayor cantidad de matriz extracelular²⁰.

4.3. Estrés oxidante y daño hepático

La comprensión de los mecanismos de daño hepático ha avanzado en los últimos años, lo que ha permitido tener nuevas alternativas en la prevención y tratamiento de los padecimientos hepáticos. Además ello ha sido decisivo para reconocer el papel que juegan los diferentes tipos celulares hepáticos, tanto en la fisiología del hígado normal, como en la participación y blanco de la enfermedad. Se considera que una gran variedad de factores pueden iniciar el daño hepático, entre ellos los fármacos, el sistema inmunitario, los virus de la hepatitis, el etanol, la sobrecarga de hierro, cobre, la hipoxia y las endotoxinas¹⁹.

Estos factores actúan inicialmente sobre una o más células blanco para iniciar el daño a través de la participación de mediadores intracelulares y extracelulares como las especies reactivas de oxígeno, citocinas, eicosanoides y óxido nítrico²¹. Los principales tipos celulares hepáticos están muy próximos entre sí en el órgano y tienen la capacidad multipotencial de producir diferentes mediadores químicos, que actúan de manera autocrina o paracrina. La intercomunicación de los diferentes mediadores, conduce a un proceso patogénico que incluye inflamación, necrosis, apoptosis, fibrosis, isquemia y alteración del genoma²².

Las especies reactivas de oxígeno en hígado pueden proceder de diversas fuentes: células de Kupffer, elementos hepatotóxicos con acción oxidante como los metales, el metabolismo del alcohol mediante el citocromo P₄₅₀ o con alteraciones del estado redox por daño mitocondrial, como el ocasionado por la isquemia²³.

El peróxido de hidrógeno juega un papel importante como mediador de daño en la fibrosis hepática, este es capaz de estimular la producción de citocinas por los hepatocitos. En cultivos de células estelares al exponerse a peróxido de hidrógeno, se induce lipoperoxidación y hay un incremento en la expresión del gen de la procolágena α I, esta respuesta se anula al añadir secuestradores de radicales libres y por el contrario se incrementa al agregar inhibidores de la oxido nítrico sintasa. La lipoperoxidación se encuentra elevada en la hepatitis C crónica y la elevación de la misma se relaciona directamente con el grado de fibrosis hepática de los pacientes²¹.

En el hígado se presentan dos isoformas de sintetasas de óxido nítrico²⁴, la endotelial que produce pequeñas cantidades de oxido nítrico finamente reguladas que se activa y desactiva en segundos y la inducible o inflamatoria, encontrada en macrófagos, células endoteliales, hepatocitos, células estelares y colangiocitos que producen grandes cantidades de óxido nítrico. Debido a que la forma inducible está prácticamente ausente en el hígado sano, se cree que la inducción de que el exceso de oxido nítrico sintasa durante el transcurso de los procesos inflamatorios provoca daño celular²¹.

Independientemente del agente etiológico causal de la fibrosis hepática, el incremento de radicales libres y la disminución de la defensa antioxidante es una constante. Así, las

especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno juegan un papel crucial en la inducción y progresión de la fibrosis hepática²².

4.3.1. Estrés nitrérgico y lipoperoxidación lipídica

El estrés oxidativo, puede dañar a las proteínas de manera similar, como ocurre con otras macromoléculas²⁶. Sin embargo, en el caso de las proteínas pueden ocurrir eventos diferenciales, como la oxidación parcial y en otros casos producir proteínas modificadas que pueden actuar como moduladores en algunas reacciones, favoreciendo la homeostasia celular²⁹. Además desde el punto de vista patológico existe una gran cantidad de agentes que oxidan y pueden dañar a las proteínas celulares²². El daño es identificado por los residuos aromáticos y estos son propiamente los residuos de los aminoácidos, los blancos preferidos para el ataque de las especies reactivas de oxígeno. Con el descubrimiento del óxido nítrico como producto fisiológico del metabolismo de la arginina y como mensajero intercelular, se encontró que reaccionan rápidamente con el superóxido para formar peroxinitrito, cuyos efectos biológicos son importantes en la regulación de varias funciones celulares²⁴.

La metionina y la cisteína son particularmente vulnerables a la oxidación por peroxinitrito, mientras que la tirosina y el triptófano son blancos selectivos para la nitración por el mismo. La nitración de los residuos de tirosina resulta importante, ya que impide la habilidad de la tirosina para llevar a cabo la intervención cíclica entre las formas

fosforiladas y desfosforiladas o entre las formas no modificadas y las nucleotidiladas. En este sentido la formación de peroxinitrito se encuentra favorecido cuando el óxido nítrico supera a la superóxido dismutasa en la competencia por el superóxido. Por lo que la nitrotirosina es un marcador de estrés oxidante²⁴.

Con respecto a la peroxidación lipídica, los ácidos grasos saturados o los monoinsaturados que forman parte de la membrana, son poco susceptibles al ataque de las especies reactivas de oxígeno, mientras que los poliinsaturados linoléico y araquidónico son atacados debido a la presencia de sus enlaces dobles conjugados, los que debilitan la energía de unión del átomo de hidrógeno presente en el carbono adyacente a los enlaces²¹. Es precisamente esta alta reactividad lo que hace que la peroxidación de los lípidos en los sistemas biológicos, sea un proceso de propagación autocatalítico²³.

La peroxidación de los lípidos de las membranas puede ocurrir por la vía no enzimática como por la enzimática, durante la peroxidación enzimática las especies reactivas de oxígeno inician el daño oxidativo en los lípidos de la membrana y los radicales libres de los lípidos resultantes propagan el proceso de la peroxidación²¹. Lo anterior permite la acumulación de hidroxiperóxidos que finalmente se descomponen en una gran variedad de productos terminales en donde los principales son el malondialdehído, el hexanal y el 4 hidroxinoneal²³.

Entre los marcadores usados como indicadores de la peroxidación de lípidos se incluye el 4 hidroxinonenal, que es un producto altamente reactivo de la peroxidación de los fosfolípidos de membrana y su derivado de la reacción con la 2,4-dinitrofenilhidrazina. Estos métodos miden los productos de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, tales como el malondialdehído y otros dialdehídos que son sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico denominados TBARS, este último se evalúa con métodos espectrofotométricos²¹. Por lo que la peroxidación de los lípidos es una de las principales vías de daño celular, lo que conduce a que la célula pierda sus funciones y con ello sea responsable de una gran cantidad de patologías²³.

4.4. Factor de crecimiento transformante beta 1 y fibrosis hepática

EL TGF- β 1 es una citocina implicada en el proceso de adipogénesis, condrogénesis e inhibición de la proliferación de células epiteliales, endoteliales, linfoides y hematopoyéticas³⁰. El TGF- β 1 a nivel hepático es profibrogénico, esto se ha demostrado en medios condicionados con células de Kupffer de ratas con fibrosis ocasionada por alcohol, generan la activación de las células estelares y estimulan la producción de colágena²⁵. Esto es capaz de realizarlo al inducir, la síntesis e incorporación de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágena y fibronectina. También tiene la capacidad de inducir la síntesis de receptores proteicos de adhesión celular, propiedades que permiten establecer que esta citocina tiene un papel importante en el proceso de fibrosis hepática. En particular, se ha demostrado que durante la lesión hepática el TGF- β 1 actúa como potente factor quimiotáctico en fibroblastos y como mitógeno al participar en la regeneración hepática²⁶.

La forma en que esta citocina estimula la producción de colágena en células estelares activas es cuando el ligando de TGF- β 1 se une a su receptor de tipo II, creando una combinación receptor-ligando que tiene a su vez una alta afinidad por el receptor del tipo I. Se forma un complejo tetramérico, en el que el receptor de tipo II fosforila al receptor de tipo I. Una vez formado el complejo activo, el receptor de tipo I fosforila a un miembro de la familia citosólica de las Smads, típicamente una Smad se fosforila en el residuo SSXS en el carboxilo terminal. Esto obliga a formar un dímero con el compañero común Smad4²⁶.

El heterodímero se importa hacia el interior del núcleo, donde se une al ADN y activa la transcripción del ARNm del TGF- β 1 y la colágena tipo I; de hecho el ARNm de la colágena tipo I se incrementa 20 veces más, comparado con las células estelares no activadas¹⁶.

Por esta razón, el TGF- β 1 es una citocina clave en el desarrollo de la fibrosis hepática. En las células estelares activadas favorece la transición a un fenotipo miofibroblástico, estimula la producción de proteínas de matriz extracelular e inhibe su degradación³¹. También se sabe que en hepatocitos disminuye su proliferación y favorece su apoptosis. Las investigaciones actuales se han centrado en bloquear la síntesis de esta citocina o disminuir su acción para detener o revertir la fibrosis en modelos experimentales⁴.

4.5. Daño hepático inducido por metales

Entre los metales esenciales en el organismo humano, tenemos el hierro y el cobre. Estos dos metales son micronutrientes esenciales para el ser humano⁴. La capacidad de intercambiar electrones en condiciones aeróbicas hace de ellos biocatalizadores ideales para las reacciones de oxidación y reducción fundamentales para la vida. El hierro está involucrado en la síntesis de ADN y en el transporte de oxígeno, mientras que el cobre en las defensas antioxidantes, la formación de catecolaminas, así como un componente esencial de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria y la maduración de la hormona peptídica hipofisiaria²⁷.

Ambos metales forman parte los grupos prostéticos de las enzimas de la cadena transportadora de electrones y de la fosforilación oxidativa en la mitocondria y participan en el metabolismo de colágena. Paradójicamente, su propia naturaleza química es la base de su toxicidad. Su versatilidad para catalizar reacciones químicas puede involucrarse en una producción descontrolada de radicales libres, responsables del estrés oxidante, que más adelante se explicara con el vanadio. El hígado, órgano central en el metabolismo de ambos metales, es también el principal blanco de su toxicidad²¹.

Un ejemplo de daño hepático por metales es la enfermedad de Wilson, que es un desorden del metabolismo del cobre debido a la disminución de la excreción de este metal por el conducto biliar²⁸. Por lo que el cobre se deposita en el hígado, cerebro y otros tejidos. La enfermedad de Wilson se hereda de forma autosómica recesiva²⁹. Esto pasa desapercibido en las primeras fases de la enfermedad, por la característica del hígado de compensar el daño. Asimismo el cobre se acumula en el hígado asintóticamente, de manera principal

en el citosol de los hepatocitos, luego se acumula en los lisosomas y llega a un punto en que no puede retenerse más en el hepatocito y es liberado al torrente sanguíneo; como la liberación es gradual el paciente permanece asintomático por varios años. Además, el cobre provoca necrosis en los hepatocitos y se desarrolla una hepatitis crónica, esto conlleva a una fibrosis hepática que puede progresar a cirrosis hepática; generalmente cuando el paciente presenta los síntomas neurológicos, ya hay un daño hepático permanente³⁰.

La hemocromatosis es la sobrecarga de hierro en el hígado por un incremento en la absorción de este metal a nivel del intestino delgado. El hierro se acumula en los hepatocitos, células retículoendoteliales, macrófagos y en las células epiteliales del conducto biliar. La fibrosis y el carcinoma hepatocelular son las complicaciones hepáticas que se presentan por la sobrecarga del metal²⁹.

El mecanismo por el cual el cobre y el hierro producen hepatotoxicidad es semejante: 1) Ambos son metales de transición, los cuales tienen electrones desapareados, 2) en estado libre son excelentes catalizadores y generan especies reactivas a partir de especies menos reactivas, al catalizar la formación de radicales hidroxilo a partir de formas reducidas de oxígeno²¹. La célula ha desarrollado un mecanismo para mantener al mínimo la concentración de estos metales en forma libre. Esto es llevado a cabo por proteínas como la ferritina o la metalotioneína, que permiten mantener las concentraciones fisiológicas de hierro y cobre libres en niveles mínimos y evitar que ocurran la reacción de reacciones tipo Fenton de forma continua³⁰.

La mitocondria es uno de los blancos del daño hepático inducido por cobre y hierro. En este contexto, también representa el principal sitio de generación de especies reactivas de

oxígeno por medio de la cadena respiratoria a un nivel dependiente del estado metabólico. Se ha demostrado que la acumulación crónica *in vivo* de hierro y cobre provoca lipoperoxidación de la membrana mitocondrial²⁹⁻³⁰. Por esto mismo en humanos con sobrecarga de cobre y hierro, debido a causas genéticas o adquiridas, la fibrosis y la cirrosis son hallazgos comunes²⁹.

4.6. Efecto de la atmósfera contaminada sobre el hígado

Las enfermedades hepáticas generalmente son potenciadas por el ambiente que rodea al individuo y son pocos los estudios que evalúan el efecto del aire ambiental en la glándula hepática¹⁶. En este sentido, un problema actual es la inminente contaminación ambiental que sufren las ciudades altamente urbanizadas y contaminadas en su atmósfera. La mayoría de las partículas suspendidas y contaminantes suspendidas en el aire que respiramos provienen de la combustión y quema de derivados de petróleo³¹ e incrementan el daño en pacientes con esteohepatitis hepática no alcohólica³², ya que las partículas ambientales de menos de 2.5 micras, al ingresar al organismo humano por vía inhalada, activan a las células de Kupffer, que son los macrófagos del hígado y como resultado de esto inducen la liberación de citocinas que incrementan el daño hepático en pacientes con esteohepatitis no alcohólica³².

4.7. Modelo de daño y fibrosis hepática por CCl₄

Existen varios modelos experimentales para estudiar la fibrosis hepática, los cuales intentan semejar el daño que ocurre en humanos, entre ellos se encuentran los modelos tratados con alcohol, dimetilnitrosamina, tioacetamida, CCl₄ y ligadura del conducto biliar³³.

En el presente estudio se utilizó el modelo de CCl₄, ya que permite controlar el daño, al ser dosis dependiente. El CCl₄ es una hepatoxina que causa necrosis hepática, fibrosis y cirrosis cuando se administra de manera crónica y también asemeja al daño que se presenta en el humano, con la ventaja de que puede retirarse en cualquier momento para estudiar la reversión de la fibrosis hepática³⁴.

El efecto tóxico del CCl₄ se debe a su conversión por el citocromo P₋₄₅₀ (CYP2E1) en el radical libre triclorometilo (CCl₃[°]), que es un tóxico altamente reactivo³⁴. Los radicales libres producidos localmente causan la oxidación de los ácidos grasos poliélicos presentes en el interior de los fosfolípidos de membrana. Ahí se inicia la oxidación de los lípidos de membrana y tras reaccionar con oxígeno (peroxidación lipídica), se forman peróxidos orgánicos. Esta reacción es autocatalítica puesto que se forman nuevos radicales a partir de los propios radicales peróxidos³⁴⁻³⁵.

Por tanto, la descomposición rápida de la estructura y pérdida de función del retículo endoplásmico se debe a la oxidación descontrolada de los lípidos de membrana, lo que explica por qué el daño por CCl₄ es grave y al mismo tiempo extremadamente rápida en su inicio³⁵. En menos de 30 minutos a una dosis de 0.4 g/kg de peso se produce una disminución en la síntesis de proteínas hepáticas y a las dos horas edema del retículo endoplásmico liso y disociación de los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. Se

reduce la salida de lípidos desde los hepatocitos, debido a su incapacidad para sintetizar las apoproteínas que permiten la formación de complejos con los triglicéridos y por tanto facilita la secreción de lipoproteína. El resultado la generación de un hígado graso debido a la intoxicación por CCl₄. Después se producen lesiones a nivel mitocondrial y esta va seguida por una turgencia progresiva de las células debido a un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática permitiendo una entrada masiva de calcio y muerte celular por activación de proteasas y muerte celular³⁴.

La respuesta inflamatoria causada por el CCl₄ juega un papel importante en el daño hepático. En este proceso las células hepáticas, incluyendo las células de Kupffer, células estelares hepáticas y las células endoteliales sinusoidales son activadas para secretar citocinas, las cuales son mediadores de la fibrosis hepática que permiten el depósito de matriz extracelular como consecuencia del estrés oxidante³⁵⁻³⁶.

4.8. Pruebas de funcionamiento hepático

Las pruebas de funcionamiento hepático se utilizan para dar seguimiento a un paciente sintomático o asintomático por enfermedades hepáticas³⁷. Es un método que complementa el estudio ya que puede distinguir los pacientes con enfermedad hepática crónica grave, de aquellos que tienen un mejor pronóstico en el desarrollo de la enfermedad hepática³⁸. Es importante mencionar que las pruebas de funcionamiento hepático nos proporcionan información en cuanto a la presencia o la severidad de complicaciones de las enfermedades hepáticas. Además, los diferentes tipos de enfermedades hepáticas se asocian con patrones concretos de anomalías bioquímicas³⁹.

Estas pruebas suelen ser menos invasivas y más cómodas de realizar en el paciente, ya que se determinan en el suero sanguíneo. En general, podemos dividir la patología hepática en pre-hepática, hepática y post-hepática. Las pruebas de funcionamiento hepático están conformadas por bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), protrombina y albumina. Estas se elevan o disminuyen de acuerdo al lugar y tipo de daño hepático³⁷.

Las causas pre hepáticas se refieren a un daño que no proviene del hígado y en este caso encontramos elevada la bilirrubina indirecta, mientras que las demás marcadores se hallan en sus valores normales. Con respecto a las enfermedades de origen hepático se refiere a todas aquellas que afecten al parénquima hepático y estas elevan las enzimas que nos indican daño y lesión hepática, como son la ALT y AST, la bilirrubina directa y la disminución de la albúmina sérica, así como de la protrombina. Por último, las enfermedades de origen post hepático se refieren a los problemas obstructivos de las vías biliares, en este caso la fosfatasa alcalina se eleva. Cabe mencionar que la ALT es una enzima citoplasmática, mientras que la AST está presente como isoenzima citoplásmica y mitocondrial. El aumento de la actividad de estas enzimas en suero es resultado de la filtración a partir de células lesionadas y por lo tanto refleja la lesión de los hepatocitos. Estas enzimas están elevadas en muchas enfermedades hepáticas, pero en especial en aquellas que se asocian con una necrosis significativa de los hepatocitos, como la hepatitis viral aguda y las lesiones químicas o isquémicas. Además es importante mencionar que la ALT es relativamente específica del hígado, mientras que la AST se halla en el músculo cardiaco, los riñones, el cerebro, páncreas y las células sanguíneas, además de los

hepatocitos³⁷. Por lo que, un aumento desproporcionado o aislado de AST debe llevar a la búsqueda de orígenes extrahepáticos, en particular una lesión miocárdica o de músculo esquelético^{37,40}.

4.9. Evaluación de la biopsia hepática, índice de Knodell

La biopsia hepática permite conocer el tipo y extensión de las alteraciones histopatológicas que en conjunto con las manifestaciones clínicas, de laboratorio y de imagen, establecen las bases para el diagnóstico específico de diferentes padecimientos hepáticos. También se ha utilizado para conocer la evolución del daño, establecer el pronóstico y conocer la respuesta al tratamiento⁴¹.

El uso de la biopsia para fines diagnósticos con bases morfológicas se inicia en el año de 1930. Los primeros instrumentos para obtener fragmentos de tejido a través de una punción, tales como la aguja de Vim-Silverman, fueron mejorados con la introducción de la aguja de Menghini, que permite obtener mayor cantidad de tejido, produce menos artificios, es más fácil de realizar y causa menos complicaciones. Algunos instrumentos más recientes como la aguja tru-cut y la aguja de Jamshidi han mejorado todavía más esta técnica⁴¹. Una vez que se obtiene el tejido hepático se fija con formol al 10%. Posteriormente se tiñen los cortes histológicos y esto se realiza con hematoxilina y eosina, también se utilizan tinciones especiales como la tinción de Masson, ya que esta nos permite definir la localización y cantidad de colágena tipo I, indispensable en el diagnóstico de hepatitis crónica, en fibrosis hepática y en todos los tipos de cirrosis. Además de la tinción del estroma, el tricrómico de Masson exagera la coloración rojiza del hialino de Mallory y los cuerpos acidófilos⁴².

Además, se han introducido diferentes técnicas que nos permiten mejorar el diagnóstico al aplicar técnicas como la inmunohistoquímica, por ejemplo la utilidad de la citoqueratina 7 para identificar epitelio biliar y reacción ductular, por lo que se recomienda para facilitar la identificación de estas estructuras. La actina de músculo liso que identifica las células estelares hepáticas activadas. Anticuerpos especiales para el diagnóstico de hepatopatías inflamatorias y en lesiones neoplásicas⁴²⁻⁴³.

Las escalas de clasificación y evaluación de las lesiones hepáticas son utilizadas en la práctica clínica como una herramienta de respaldo para las decisiones médicas. La calificación de las lesiones en una biopsia hepática tiene diversas ventajas, una de ellas es artificial, que provee un dígito simple que parece más objetivo que la evaluación óptica descriptiva que es subjetiva y semicuantitativa⁴².

Hay varias maneras de interpretar una biopsia hepática, los métodos más comunes son el índice de actividad histológica o también llamado índice de Knodell y el índice de METAVIR que fue diseñado específicamente para pacientes con hepatitis C.

El método de Knodell está compuesto por cuatro números que se asignan por criterios individuales y forman una sola puntuación. El primer componente se clasifica del 0-10 y los tres restantes del 0-4, lo que resulta en una suma total de 0 a 22. Las tres primeras puntuaciones (necrosis periportal, degeneración intralobulillar, necrosis focal e inflamación portal) componen la parte inflamatoria de la puntuación y son indicativas del grado de inflamación que existe en el hígado. El cuarto componente (fibrosis) señala la cantidad de tejido cicatrizado en el hígado y se clasifica de 0 como ausencia de fibrosis hasta 4 como cirrosis⁴⁴.

4.10. Reversión de la fibrosis hepática

Antiguamente la opinión tradicional era de que la cirrosis era una enfermedad irreversible, la evidencia reciente indica que aún una fibrosis avanzada es reversible¹⁴. Esto se ha demostrado en modelos experimentales con fibrosis hepática, que en estadios avanzados de fibrosis estos revierten. En los seres humanos la reversión de la fibrosis hepática puede ocurrir después de un tratamiento exitoso de la causa subyacente. Esto ha sido informado en pacientes con sobrecarga de hierro, cobre, el daño inducido por la ingesta de alcohol, hepatitis C y en hepatitis autoinmune⁴⁵.

Durante la reversión de la fibrosis hepática en modelos animales, el número de células estelares disminuye y la integridad del tejido se restablece¹⁵. Hay dos teorías que explican la reversión de la fibrosis, la primera mediante la reversión de la activación de las células estelares y la segunda mediante la eliminación de células estelares activadas por apoptosis⁴⁶. Se ha observado en cultivos que las células estelares pueden revertir a células quiescentes, pero no se ha demostrado *in vivo*^{15, 46}.

Así, la apoptosis de las células estelares activadas aumenta durante la resolución de la fibrosis hepática. Uno de los factores que regula la apoptosis en células estelares transformadas es el TNF- α , ya que promueve su supervivencia vía NF- κ B. Esto se demostró con gliotoxina, que es una toxina de un hongo que inhibe la activación de NF- κ B e induce apoptosis de las células estelares en ratones tratados con CCl₄ en donde el grado de daño hepático y fibrosis fue mínimo⁴⁷.

4.11. Vanadio

4.12. Metabolismo del vanadio

El vanadio es un elemento que se encuentra naturalmente en el ambiente, con apariencia de un metal blanco grisáceo en forma de cristales. El vanadio puro no tiene olor. En la naturaleza se encuentra combinado con otros elementos tales como el oxígeno, sodio, azufre o con cloruro. El vanadio y los compuestos de vanadio pueden encontrarse en la corteza terrestre y en las rocas, en minerales de hierro y depósitos de petróleo crudo⁴⁸, figura 6.

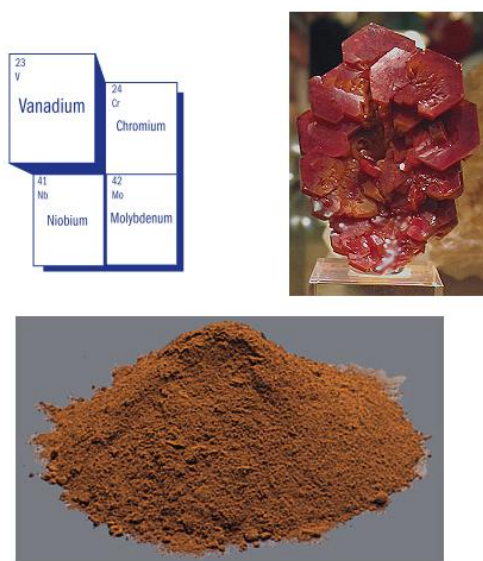


Figura 6. Representación del vanadio y características del metal. El vanadio ocupa el lugar número 23 de la tabla periódica y este se encuentra como mineral en el ambiente.

El vanadio fue descubierto en 1802-1803, por el mineralogista español Don Andrés del Río en México a partir del mineral plomo pardo (vanadinita) llamado “pancromio”, un nombre referido por la variedad de colores que el vanadio despliega cuando pasa por sus diversos estados de oxidación. Del Río lo llamó “Eritronio” debido a que las sales de este elemento se tornan rojas cuando se tratan con calor y ácidos. Al poco tiempo de su descubrimiento se pensaba que sólo era una nueva forma de cromo y se desdijo su descubrimiento^{49, 56}. El elemento fue redescubierto por el químico sueco Nils G. Sefström en 1831 y lo llamó “vanadin” (vanadio) en honor a Vanadis, la diosa de la belleza de los antiguos arios^{50, 56}. En este año, Wöhler estableció la identidad de eritronio como vanadio, en la tabla 2 se muestran sus características físicas y químicas del vanadio⁵¹.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del vanadio. Tomado de Barceloux DB. J Toxicol Clin 1999.

PROPIEDADES FÍSICAS	
Punto de fusión	1980+ 10°C
Punto de ebullición	3380 °C a 1 atm
Color:	Gris plateado brillante
Densidad	293 K: 5.8 g/cm ³
Clasificación	Metal de transición
Resistencia	39.4
Conductividad	4.0 10 ⁶ omg ⁻¹ cm ⁻¹
PROPIEDADES QUÍMICAS	
Nombre	Vanadio
Símbolo	V
Peso atómico	23
No. atómico	50.942 g/mol
Grado de oxidación	-1 a +5
Compuestos que forman	Ferrovandio, pentóxido de vanadio (V ₂ O ₅)
	Trióxido de vanadio (V ₂ O ₃), dicloruro de vanadio (VCl ₂), tricloruro de vanadio (VCl ₃), tetracloruro de vanadio (VCl ₄), dióxido de vanadio (VOH ₂), ácido metavanádico HVO ₃ .

Metabolismo

Para la población en general, los alimentos representan la mayor fuente de exposición a vanadio, seguida de la vía aérea. La entrada del vanadio al organismo de los mamíferos ocurre a través de la piel, por el tracto gastrointestinal y por el sistema respiratorio. La absorción por la piel es mínima, varios reportes coinciden en que el 10% del vanadio es ingerido y el 25% inhalado es transportado a varios tejidos del cuerpo por el torrente sanguíneo⁴⁹, figura 7.

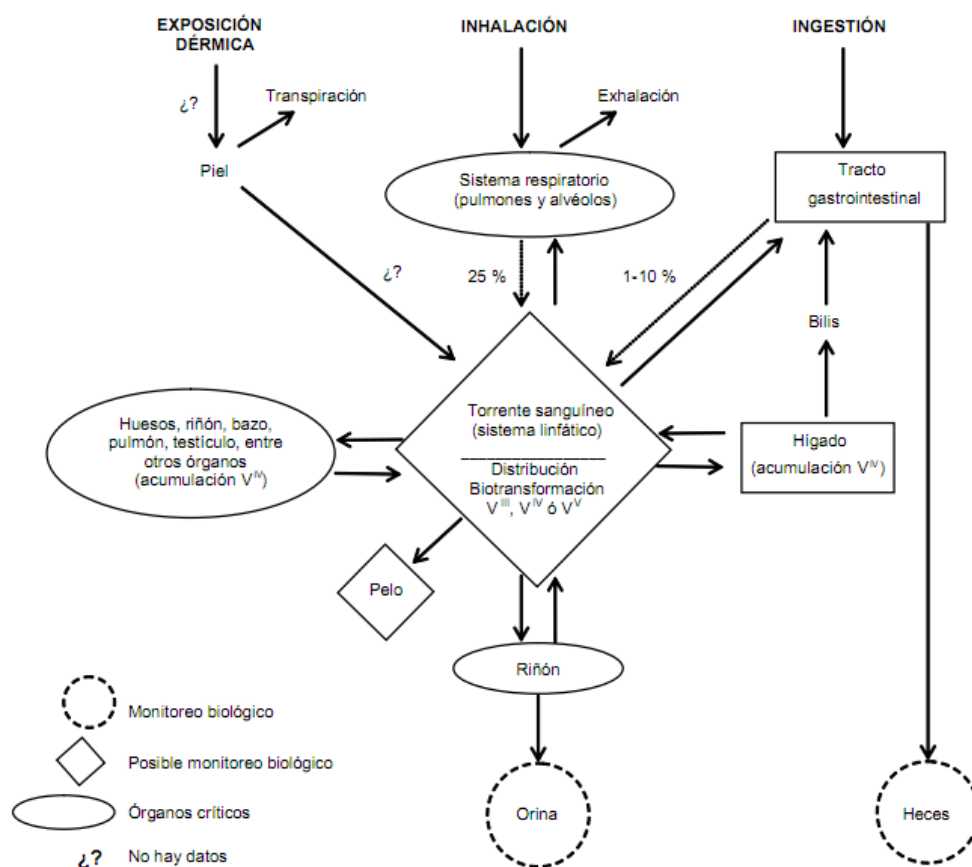


Figura 7. Toxicocinética del vanadio. Tomado de la Rev. Int. Contam. Ambient. 2006.

Una vez que ha sido absorbido puede encontrarse en estados de oxidación III, IV y V. El V^V es reducido a V^{IV} por el glutatión de los eritrocitos o por el ácido ascórbico, las catecolaminas y otras sustancias reductoras del plasma⁵⁶. No se conoce bien la biocinética del V^{III} , pero debido a la presencia de oxígeno en la sangre es posible que pueda ser oxidado a V^{IV} ó V^V y parte permanece como V^{III} unido a diferentes ligandos⁴⁹.

El vanadio es transportado por la albúmina y preferentemente por la transferrina. Las condiciones de pH neutro propician el predominio de V^V en el plasma. Se tiene bien establecido que el V^V entra a la célula por mecanismos de transporte aniónico, principalmente por los canales de fosfato. En el interior de la célula, el V^V puede ser nuevamente reducido a V^{IV} por el glutatión y otros sustratos donde permanece unido⁵⁶.

Algunos estudios de farmacocinética en eritrocitos demuestran que la entrada de vanadio al interior de la célula se da en dos etapas, cada una regida por un mecanismo en particular. En la etapa inicial, V^V cruza la membrana celular a través del sistema de intercambio aniónico, en tanto que en la segunda etapa el cruce es mucho más lento e involucra el producto reducido, V^{IV} y un mecanismo de paso semejante al de los cationes divalentes. De hecho, se ha descrito que el vanadio ingerido es transformado por el estómago a su forma catiónica antes de empezar a ser absorbido en el duodeno, además de que la absorción de VO^{2+} es cinco veces menor en comparación con la presencia de la forma aniónica (VO_4^{3-})⁵¹.

En animales de experimentación, la entrada del metal está en función de la ruta de administración, el tipo de tratamiento y las propiedades del compuesto. Independientemente de la forma en que se aplique, el vanadio se acumula exclusivamente como V^{IV} . Los

órganos que lo acumulan son el hígado, riñón, hueso y bazo, mientras que en pulmones y testículos se concentra en menor cantidad. También se ha detectado en corazón, tiroides, cerebro, musculo esquelético, médula ósea y tejido graso. Los órganos que no remueven con facilidad el metal son el hueso, músculos y pulmón, en el que permanece por tiempo prolongado⁵².

El V^{IV} ó V^V administrado a ratas vía intratraqueal o intraperitoneal se distribuye en el núcleo, las mitocondrias, los microsomas y en el citoplasma en células de hígado⁵².

Diversas pruebas bioquímicas demuestran que el vanadio en estados de oxidación IV y V, interactúa en concentraciones de micromoles con muchas moléculas orgánicas, incluyendo proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares. En la célula, el vanadio tiene la capacidad de reemplazar los grupos fosfato, carboxilo y amino de las biomoléculas⁵¹.

En trabajadores expuestos a óxidos de vanadio y en modelos animales, el vanadio absorbido es rápidamente desechado por los riñones y la bilis, excretado en la orina o en las heces. La cinética de eliminación por la orina sigue un comportamiento bifásico, en las 20 primeras horas se excreta la mayor cantidad y de 40 a 50 días la otra parte. Un dato importante es que el vanadio en modelos animales puede cruzar las barreras hematotesticular y placentaria e inducir alteraciones en las diferentes células del testículo y en el desarrollo embrionario y fetal⁵¹.

4.13. Usos y fuentes del vanadio

Los usos del vanadio son en las aleaciones con el acero, el bronce y el hierro para la producción de ferrovandio, donde solo una pequeña porción de vanadio proporciona gran fuerza y elasticidad. Las aleaciones de vanadio dan dureza y durabilidad a herramientas para corte y taladros de alta velocidad, además también son utilizados en la agricultura como fertilizantes^{49, 51} figura 8.



Figura 8. Usos del vanadio. El vanadio es utilizado principalmente en herramientas industriales.

De los compuestos de vanadio el pentóxido es el más utilizado, sobre todo en la industria química como catalizador de reacciones químicas y para ablandar el acero. También es utilizado como revelador y sensibilizador fotográfico y en la elaboración de vidrio.

El vanadilo y el dicloruro de vanadilo son utilizados como pigmentos en la industria del vidrio, de la cerámica y en la industria textil, por otro lado, los óxidos y vanadatos forman parte de las administración de vanadio para la elaboración de sustancias luminiscentes⁵².

4.13.1. Mecanismo de acción del vanadio

El vanadio tiene varios efectos en la célula, a una dosis de 0.02 M induce la formación de micronúcleos en la médula ósea, linfocitos y en un reporte por parte de nuestro laboratorio, meganúcleos y binucleación en hepatocitos. Además, se ha observado un aumento en la frecuencia de células poliploides y binucleadas en linfocitos humanos tratados con V_2O_5 . Estos cambios se han explicado por la acumulación de células en fase G2, lo que impide que se lleve a cabo la mitosis⁵³. Por otro lado, estos efectos pudieran ser resultado de la interacción del vanadio con la polimerización de tubulinas, lo que resulta en alteraciones en la formación y función del huso mitótico¹⁰.

Además el vanadio puede provocar fibrosis, proliferación celular y efectos antiapoptóticos, lo cual se explica con la generación de radicales libres y peroxidación lipídica por parte de este metal, además de las propiedades miméticas que tienen con los grupos fosfato⁵⁴.

Se ha demostrado que el vanadio se acumula en el espacio intermembranal de las mitocondrias y bloquea el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, lo que causa inhibición de la primera unión de $NADH$ ⁵⁶. Además provoca cambios en la actividad de la adenilato ciclasa, ribonucleasas y la reducción en los niveles de coenzima A en el hígado⁵⁶. Se ha demostrado que el vanadio tiene efecto diurético y natriurético, y es capaz de inhibir a la APTasa de Na^+/K^+ ⁵³.

Los compuestos de vanadio también tienen efectos hipoglucemiantes, al inhibir competitivamente las fosfatasa reguladoras de proteínas, específicamente la fosfatasa 1B, que es la primera en la cascada reguladora de la insulina^{48, 55} (figura 9).

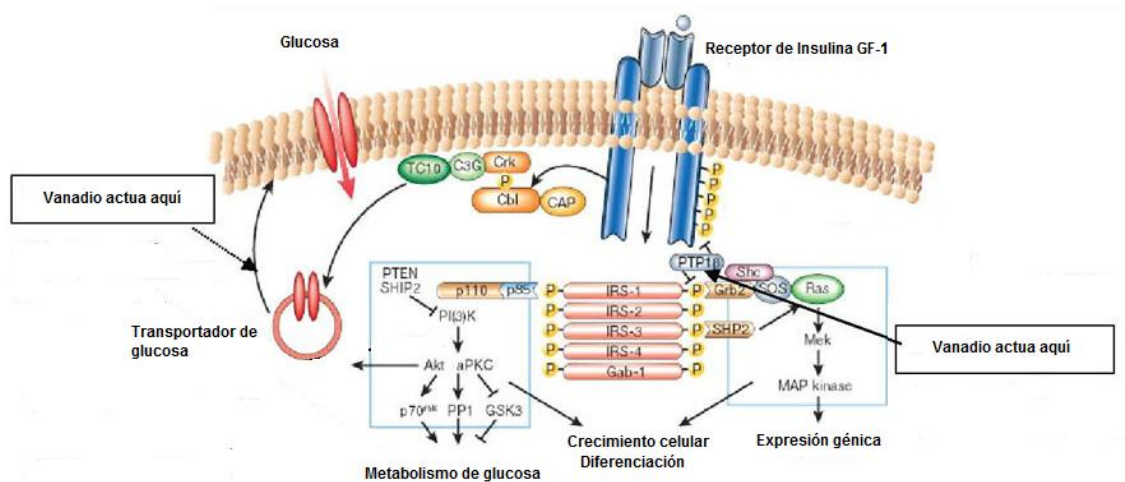


Figura 9. Mecanismo de acción del vanadio. Se representan los lugares de acción del vanadio, en el receptor de insulina, tomado de Barceloux DG. J Toxicol Clin Toxicol 1999;37:265-78.

4.14. Papel del vanadio como contaminante ambiental

En la naturaleza el vanadio no se encuentra en forma pura, ya que es propenso a reaccionar con otros elementos. Sin embargo, su liberación en la atmósfera es principalmente ocasionada por la actividad humana, por lo que es considerado un contaminante ambiental⁵⁶.

Se ha estimado que de las 64 mil toneladas de vanadio descargadas anualmente a la atmosfera, alrededor del 91% son producto de la actividad industrial, de la combustión del petróleo, de carbón y de aceites pesados y el resto son derivados de la erosión del suelo, emisiones volcánicas, incendios forestales y otros procesos biogénicos⁵⁶.

Los niveles en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización, entre otros factores. En grandes urbes se han detectado concentraciones en el aire que van de 0.15 a 1.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y en áreas rurales cantidades menores a 0.024 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En el agua para beber se describen valores por debajo de 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, con un promedio de 4.3 $\mu\text{g}/\text{L}$. Se han reportado concentraciones que van de 49.2 a 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ríos cercanos a minas y mantos acuíferos ubicados cerca de zonas industriales⁵⁶.

Las concentraciones en el agua de mar están en un rango de 1 a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con valores máximos de 7 $\mu\text{g}/\text{L}$ y de hasta 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso seco en sedimentos costeros. El desgaste de las rocas oceánicas y de los minerales terrestres libera vanadio en el agua y en el aire. Se considera que la concentración promedio de este metal en el suelo es alrededor de 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso seco, pero en los suelos cercanos a plantas metalúrgicas los valores superan los 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ ⁵⁷.

4.15. Niveles de vanadio en México

Para la ciudad de México se han reportado valores que alcanzan $0.114 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en aeropartículas de $10 \mu\text{m}$ y $0.093 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en las de $2.5 \mu\text{m}$ ⁵⁸. Es importante mencionar que la mayoría del vanadio en nuestro ambiente proviene de la combustión de derivados del petróleo. Los petróleos de América son lo que contienen más vanadio, en el crudo proveniente de Venezuela las concentraciones van de 282 a 1180 $\mu\text{g}/\text{g}$, en la variedad de Canadá y la maya de México el contenido es de 640 y 243 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente⁵⁶. En cenizas, residuos sólidos u hollín se pueden encontrar de 600 a 700 $\mu\text{g}/\text{g}$.

Para la regulación de las partículas suspendidas totales se dictó la NOM-024-SSA1-1993. En la cual dan los lineamientos para prevenir, restablecer y mantener la calidad del aire y las acciones a realizar para reducir la emisión de contaminantes. Esta norma se establece como partículas suspendidas totales a la contaminación del aire provocada por material sólido o líquido finamente particulado, que se les considera capaces de bloquear los mecanismos de defensa del aparato respiratorio, tanto a nivel de vías aéreas superiores como en bronquios y alveolos. Los límites del material particulado y no debe rebasar el límite máximo permisible de $260 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 horas, en un periodo de un año y $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en una media aritmética anual, para la protección a la salud de la población susceptible. Cabe mencionar que en México está muy lejos de cumplirse la norma tal como lo demostró Fortoul et al. 2002, al demostrar que las concentraciones de metales en la atmósfera de la ciudad de México van en aumento⁵⁹.

4.16. Efectos del vanadio en la salud humana

Los efectos de los compuestos de vanadio van a depender del tipo de exposición y compuesto, por lo que se han descrito efectos benéficos y tóxicos de acuerdo a lo antes mencionados en la tabla 3 se muestran los diferentes compuestos de vanadio y sus dosis en animales experimentales^{48, 56}.

Tabla 3. Compuestos de vanadio y efectos a diferentes dosis en modelos experimentales.

Tabla tomada de NTP Technical report, vanadium pentoxide, NTP TR 507, 2002.

Compuestos y dosis de vanadio en modelos animales

Compound	Species	Dose/Exposure	Route	Parameter
V ₂ O ₅ ^a	Rat	70 mg/m ³ /2 hours	Inhalation	LC _{L0}
	Cat	500 mg/m ³ /23 minutes	Inhalation	LC _{L0}
	Rat	12 mg/kg	Intraperitoneal	LD ₅₀
	Rat	14 mg/kg	Subcutaneous	LD ₅₀
	Rat	10 mg/kg	Oral	LD ₅₀
	Mouse	10 mg/kg	Subcutaneous	LD ₅₀
	Mouse	23 mg/kg	Oral	LD ₅₀
NH ₄ VO ₂ ^b	Rat ^c	160 mg/kg	Oral	LD ₅₀
	Rat	20 - 30 mg/kg	Subcutaneous	LD ₅₀
	Mouse	25 - 30 mg/kg	Subcutaneous	LD ₅₀
	Rabbit	1.5 - 2 mg/kg	Intravenous	LD ₅₀
	Guinea pig	1 - 2 mg/kg	Subcutaneous	LD ₅₀
Na ₃ VO ₄ ^d	Rat _b	330 mg/kg	Oral	LD ₅₀
	Rat	50 - 60 mg/kg	Subcutaneous	LD ₅₀
	Mouse	36 mg/kg	Intraperitoneal	LD ₅₀
	Mouse _b	50 mg/kg	Subcutaneous	LD _{L0}
	Rabbit ^b	2 - 3 mg/kg	Intravenous	LD ₅₀
	Guinea pig ^b	1 - 2 mg/kg	Subcutaneous	LD ₅₀
Na ₃ VO ₃ ·H ₂ O ^e	Mice	11 mg/kg	Intraperitoneal	LD ₅₀
VOCl ₃ ^a	Rat	140 mg/kg	Oral	LD ₅₀
V ₂ O ₃ ^e	Mice	130 mg/kg	Oral	LD ₅₀
VCl ₂ ^a	Rat	540 mg/kg	Oral	LD ₅₀
VCl ₄ ^a	Rat	160 mg/kg	Oral	LD ₅₀
VCl ₃ ^a	Rat	350 mg/kg	Oral	LD ₅₀
	Mice ^e	23 mg/kg	Oral	LD ₅₀
	Rabbit	20 mg/kg	Subcutaneous	LD _{L0}

La toxicidad del vanadio se demostró en trabajadores laboralmente expuestos al metal, como son en limpiadores de chimeneas, fundiciones o en la quema de petróleo. En este caso los óxidos de vanadio presentes en las partículas de menos de 10 μm de diámetro de las cenizas y polvos, producto de la quema de combustible fósil, están asociados con efectos adversos a la salud⁵⁶. La exposición crónica por inhalación en ambientes laborales induce cambios en los órganos respiratorios y la aparición de bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis, en algunos casos produce cambios en el ritmo cardíaco y la aparición de un color verdoso en la lengua de los trabajadores. También se han reportado alteraciones bioquímicas en sangre, como la disminución de grupos sulfhidrilo y cambios en la concentración de la albúmina y del colesterol⁵⁷.

La exposición aguda (de 0.2 a 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) a polvos de vanadio (V_2O_5) en personas voluntarias, indujo síntomas como tos, irritación de nariz y mucosa oral, mientras que una fuerte exposición aguda causó irritación sensorial, fiebre, conjuntivitis, aumento del movimiento intestinal, dermatitis, vómito, diarrea, problemas respiratorios, temblores y daño renal⁵⁹. En estudios de los efectos de diversos metales dispersos en el aire urbano sobre la población, se encontraron ligeras correlaciones entre los niveles de vanadio y la mortalidad producida por ciertos cánceres, neumonía y bronconeumonía⁵⁶. De la misma manera, se observó correlación entre los niveles de vanadio en partículas aéreas y la incidencia de enfermedades cardiovasculares⁵⁷.

En un estudio realizado por Fortoul et al (2002), se detectó que la cantidad de vanadio aumentó en el pulmón en autopsias practicadas a residentes de la ciudad de México que vivieron en la década de los 90 ($1.36 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{g}$ en peso seco de pulmón) en comparación

con los que vivieron en la década de los 60 (1.04 ± 0.05 $\mu\text{g/g}$ en peso seco de pulmón). Las concentraciones halladas no correlacionaron con el género, la edad, los hábitos al cigarro, su ocupación o la causa de muerte. Lin et al (2004) detectaron 0.42 ± 0.24 ng/mL de vanadio en muestras de sangre de estudiantes de la ciudad de Taiwan, cuando en la literatura se reportan valores de 0.10 ± 0.017 ng/mL en residentes cercanos a zonas industriales y de 0.032 a 0.095 ng/mL para la población general. Así también en un estudio realizado por Rivero-Rosas et al (1997) demostró la presencia de metales en ambiente de la ciudad de México, entre ellos el vanadio⁷¹.

4.17. Efectos benéficos del vanadio

Respecto a los efectos benéficos del vanadio en la salud humana. Los compuestos del vanadio han sido objeto de investigación como agentes que disminuyen los niveles séricos de glucosa, como antihipertensivos, anorexigénico y como se ha visto previamente como anticancerígeno^{56, 60}. El efecto tipo insulina de los compuestos del vanadio sobre células y animales diabéticos se ha estudiado desde hace varios años⁵⁰. En estudios realizados en humanos se ha demostrado que las sales y los complejos de vanadio mejoran los síntomas de la diabetes a una dosis de 10 mg de sulfato de vanadilo⁵⁰.

Este efecto es atribuido a una acción sinérgica sobre la insulina a través de la inhibición competitiva del vanadio sobre fosfatasa regulatorias de proteínas, específicamente la fosfatasa 1B, que es la primera en la cascada regulatoria de la insulina⁵⁰. Sin embargo, el vanadio suministrado oralmente en animales preñados es tóxico e inefectivo tanto por no

normalizar la glucemia como por interferir con el desarrollo del feto⁵⁷. El sulfato de vanadilo (VOSO_4) disminuye y mantiene normalizada la presión sanguínea en ratas espontáneamente hipertensas⁵⁷. El vanadio altera los niveles de neuropéptido Y en hipotálamo y como consecuencia, disminuye el apetito y el peso corporal. El VOSO_4 (en una dosis de 60 mg/día) es utilizado en nuestros días por atletas que realizan levantamiento de pesas como anabólico para mejorar su rendimiento⁵⁶.

Así en los últimos años distintos complejos orgánicos y compuestos inorgánicos del vanadio han adquirido importancia especial en la farmacología⁵¹. Son empleados en la terapia contra la diabetes, en la obesidad y en la biología de la reproducción como anticonceptivo vaginal^{51,60}. Además por sus propiedades moduladoras de la expresión de diversos genes, es usado en modelos experimentales como agente anticarcinogénico⁶⁰.

Estas propiedades se han observado en modelos de cáncer hepático, en el que el vanadio ha demostrado inducir la expresión de p53 y apoptosis, así como la supresión de Ki-67 en un modelo experimental de hepatocarcinoma en ratas⁵⁹. Asimismo en medios de cultivo para el hepatoma de Morris 5123, el vanadio tiene efectos citotóxicos sobre las células tumorales^{59,60}.

4.18. Vanadio y fibrosis

Cuando el vanadio ingresa a nuestro cuerpo por vía inhalada el órgano más afectado es el pulmón, al ser el primero en entrar en contacto con este metal⁵⁶. En general, la intoxicación aguda por inhalación de vanadio produce edema pulmonar, bronconeumonía, bronquitis, rinitis, hemorragia pulmonar, traqueítis, enfisema y fibrosis de las vías aéreas, ya que el vanadio provoca un estado irritativo crónico en el sistema respiratorio, lo que conduce a un estado inflamatorio crónico. Esto conduce a una metaplasia del epitelio respiratorio y fibrosis. En este caso hay una proliferación importante de miofibroblasto que provocan más fibrosis pulmonar⁵⁶. De hecho se ha sugerido que este estado inflamatorio crónico induce la proliferación en el epitelio pulmonar, al encontrarse una elevada concentración del factor estimulante de plaquetas (PDGF) y elevar la actividad de IL-1 β . Por otro lado, la progresión de la fibrosis pulmonar en ratas expuestas a 1 mg/kg de pentóxido de vanadio se detuvo a través de un inhibidor de tirosina cinasa específico para la PDGF y el factor de crecimiento epidermal, lo que sugiere que los receptores de crecimiento están involucrados en la producción de miofibroblasto pulmonares y la producción de colágena⁵⁶. Con respecto a si el vanadio produce fibrosis en el hígado, esto no ha sido observado en nuestros experimentos con pentóxido de vanadio en ratones CD-1 por 6 semanas⁶¹.

4.19. Papel del vanadio en el hígado

El vanadio es metabolizado en el hígado, ya que el hígado es el órgano que se encarga de detoxificar las sustancias que llegan al cuerpo humano. Esto ocurre en el retículo endoplásmico de los hepatocitos⁵⁶.

Además, regula el metabolismo de la glucosa en el hígado. El vanadio incrementa el ingreso de la glucosa y su oxidación, con la consecuente producción de glucógeno e inhibe la gluconeogénesis por parte de las células hepáticas⁶⁵. Esto se ha observado por vía oral y al ser pobremente absorbido por vía digestiva las concentraciones en el organismo no llegan a ser tóxica. Por ejemplo, con el sulfato de vanadil 10mg ha disminuido un 20% la concentración de la glucosa en sangre y disminuye la producción de glucosa por parte del hígado, durante la hiperinsulinemia⁵⁷. El vanadio como lo hemos descrito inhibe los receptores acoplados a la tirosina cinasa en el hepatocito⁵⁵.

También produce efectos tóxicos en el hepatocito, al inducir peroxidación lipídica en la membrana de los hepatocitos⁵⁶. En ese sentido en nuestro laboratorio se observó un incremento en la lipoperoxidación, infiltrado inflamatorio, así como el incremento de células binucleadas y meganúcleos⁶¹. Asimismo, se han descrito efectos terapéuticos a nivel hepático, principalmente en los modelos de cáncer hepático⁶⁰, por ejemplo se ha demostrado que en el modelo experimental de carcinogénesis hepática el vanadio a una dosis de 2 mg indujo apoptosis de las células malignas y la supresión de MT y Ki-67^{7, 9-10}.

4.20. Modelo de administración de vanadio por vía inhalada

Como ya se mencionó el vanadio se encuentra en la naturaleza y en el ambiente de varias formas⁵⁶. En la atmósfera lo encontramos como pentóxido de vanadio V_2O_5 , que es el principal precursor de los diferentes derivados químicos del vanadio. Es un catalizador de la transformación de sulfato a sulfito y del acetaldehído a alcohol. En modelos experimentales se ha expuesto el vanadio por vía inhalada o instilado vía intratraqueal a una dosis de 0.02 M y este es recuperado en la sangre de los animales expuestos después de una hora de exposición. Por esta vía el vanadio se deposita en el hígado, riñón, hueso y bazo. De estos órganos el vanadio es eliminado rápidamente de los diferentes órganos excepto del hueso. Entre los efectos tóxicos que se producen en modelos experimentales expuestos a pentóxido de vanadio por vía inhalada se incluyen edema pulmonar, rinitis, bronconeumonía, rinitis y traqueítis⁵⁷.

Además, la exposición a pentóxido de vanadio en el lugar de trabajo ocurre en los trabajadores que limpian chimeneas, calderas y fundidoras, así como en aquellos que se encuentran en refinерías o en la fundición de rocas para la obtención de este metal. En este tipo de personal el vanadio llega a alcanzar concentraciones de 35 mg/m^3 en el aire que respiran. En tejido humano se ha llegado a reportar la concentración de vanadio de 0.3 mg/g ^{56, 61}.

5. Planteamiento del problema

La muerte por fibrosis hepática en nuestro país y a nivel mundial es un problema de salud pública. Se realizan varios estudios para detener la progresión de la fibrosis hepática y evitar a que está llegue a ser irreversible. En este sentido se ha demostrado que tiene efectos benéficos en modelos de cáncer hepático, sin embargo no se ha evaluado el efecto del vanadio en el desarrollo y la progresión de la fibrosis hepática.

6. Hipótesis

El vanadio reducirá el daño hepático y el progreso de la fibrosis en el modelo de fibrosis hepática por CCl₄ en ratones.

7. Justificación

La mortalidad por complicaciones por fibrosis hepática ocupa los primero lugares a nivel nacional y mundial. Actualmente hay un interés prioritario para encontrar tratamientos que detengan o reduzcan la progresión de la fibrosis hepática. Lo que resultaría en una mejor calidad de vida de los pacientes que cursan con esta enfermedad. Por lo que resulta de interés estudiar el efecto del vanadio en la fibrosis hepática en un modelo de fibrosis hepática por CCl₄.

8. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del V_2O_5 por vía inhalada en el modelo de fibrosis hepática por CCl_4 .

Objetivos específicos

Identificar las alteraciones histológicas de cada grupo.

Evaluar el grado de fibrosis hepática con el índice de Knodell, en cada grupo.

Evaluar las PFH en sangre, en cada grupo.

Cuantificar el daño por estrés oxidante por inmunohistoquímica para 4-hidroxinonal y nitrotirosina, en cada grupo.

Identificar la activación de células estelares por inmunohistoquímica con alfa actina de musculo liso, en cada grupo

Determinar el contenido de TGF- β 1 por western blot, en cada grupo.

9. Material y métodos

9.1. Animales, vanadio y CCl_4

Se utilizaron 40 ratones CD-1 de 30 gramos de peso, divididos en 4 grupos; un grupo control, un grupo expuesto a V_2O_5 , un grupo tratado con CCl_4 y un grupo expuesto a V_2O_5 y CCl_4 . El grupo control se trató con el vehículo durante 6 semanas. La exposición al V_2O_5 se realizó por vía inhalada con una concentración de 0.02 M, en una caja de acrílico, con un

flujo de de 10 L/min, la concentración de V_2O_5 se cuantifico con la colocación de filtros en la salida del ultranebulizador (UltraNeb 99 De Vilbis). La concentración de V_2O_5 en la cámara de inhalación es de un promedio de 1.436 g/m³ durante cada exposición. Cada exposición se realizó dos veces a la semana por 1 h durante 6 semanas. El tratamiento con CCl_4 se aplicó vía intraperitoneal a una dosis de 0.4 g/kg, 2 veces a la semana durante 6 semanas. Y en el grupo tratado con la exposición a vanadio y CCl_4 , se realizaron los 2 procedimientos antes descritos durante 6 semanas. Todos los grupos se sacrificaron por dislocación cervical, a las 6 semanas de exposición, para la obtención de las muestras.

9.2. Obtención de tejidos

Posterior a la eutanasia de los animales, se realizó la obtención del hígado, en donde se realizaron cortes longitudinales. El tejido se fijó en formol amortiguado al 4%, se incluyó en parafina y se procesó para obtener las preparaciones histológicas.

Se hicieron cortes seriados de los tejidos, a los que se les realizó una tinción con hematoxilina y eosina (HE) para el estudio morfológico, tinción de Masson para determinar el grado de fibrosis y se evaluaron el 4-hidroxinonanal y nitrotirosina por la técnica de inmunohistoquímica para evaluar el daño por estrés oxidante.

9.3. Evaluación histológica e índice de Knodell

Las biopsias fueron revisadas simultáneamente por dos observadores con experiencia en la evaluación de tejido hepático, sin conocimiento de los tratamientos en el momento de revisión. La morfología hepática se evaluó de acuerdo al índice de Knodell antes descrita, para identificar y gradificar la inflamación, el daño hepático y la fibrosis hepática. Se anexa tabla de evaluación, tabla 3.

Tabla 3. Gradificación de las biopsias hepáticas.
Escala de Knodell

Necrosis periportal en puente	No.	Degeneración intralobulillar y necrosis focal	No.	Inflamación portal	No.	Fibrosis	No.
Nada	0	Nada	0	Nada	0	Nada	0
Leve	1	Leve (cuerpos acidófilos degeneración globoide y/o focos diseminados de necrosis hepatocelular en <1/3 de los espacios de lóbulos o nódulos.	1	Leve (células inflamatorias diseminadas en 1/3 de los espacios porta)	1	Expansión portal por fibrosis.	1
Moderada (involucra menos del 50% de la circunferencia de la mayoría de espacios porta)	3	Moderada (afecta 1/3-2/3 de los lóbulos o nódulos)	3	Moderada (mayor infiltrado en 1/3-2/3 de espacios porta).	3	Fibrosis en puente (porto-portal o porto central)	3
Necrosis grave en sacabocado (afecta >50% de la circunferencia de la mayoría de espacios porta).	4	Grave (afecta <2/3 de los lóbulos o nódulos)	4	Grave (infiltrado denso en >2/3 de los espacios porta).	4	Cirrosis	4
Necrosis moderada en sacabocado + necrosis en puente.	5						
Necrosis grave en sacabocado + necrosis en puente.	6						
Necrosis multilobular.	10						

9.4. Determinación de las pruebas función hepática

Se obtuvo la sangre de los animales por punción cardíaca, la sangre se centrifugó en una centrífuga clínica a 3000 rpm durante 8 min a temperatura ambiente. Se separó el suero y se analizaron en el sistema automatizado para cada enzima: albúmina g/dL, fosfatasa alcalina UI/L, alanina aminotransferasa (ALT) UI/L, aspartato aminotransferasa (AST) UI/L, bilirrubina directa, bilirrubina total UI/L (Automate Sample processing Systems, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

9.5. Determinación inmunohistoquímica para nitrotirosina, 4-hidroxinonenal y alfa actina de músculo liso

El tejido se incluyó en parafina y se obtuvieron cortes de 4 μ en laminillas que se mantuvieron por 24 h en estufa de secado a 56°C. Los tejidos se desparafinaron y se rehidrataron en baños consecutivos de xilol, alcohol y finalmente Tris. Se realizó recuperación antigénica con declere. Se realizaron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.2 (PBS) 1x por 5 min, posteriormente se realizó un lavado con PBS-albúmina por 10 minutos, después se incubó con el anticuerpo primario por 1 h, después se realizaron lavados con PBS-albúmina, después se procedió a incubarlo con el anticuerpo secundario por 30 min, después se realizó lavado con PBS-albúmina, posterior a esto se incubó con el complejo estreptoavidina-biotina, a continuación se realizaron lavados con PBS-albúmina y se reveló con diaminobencidina, para obtener el precipitado colorido, se enjuagaron y se contrastaron con hematoxilina.

Las laminillas se deshidrataron en baños consecutivos de alcohol y xilol, posteriormente se montaron en resina para ser analizadas por microscopia de luz.

Se usaron como controles positivo: hígados cirróticos de humanos. En todos los casos se tuvieron controles negativos al omitir el anticuerpo primario en el procedimiento rutinario de marcaje. Los anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo anti alfa actina de músculo liso a una dilución de 1:200 (Abcam), anticuerpo monoclonal anti 4-hidroxinonal a una dilución de 1:100 (R&D) y anticuerpo anti nitrotirosina (BD) a una dilución 1:100. Los resultados se presentaron con un índice y este resulta de la relación células positivas/células totales por 5 campos por 100. Los resultados se expresaron como medias de los índices resultantes de las células positivas de los animales por cada grupo.

9.6. Extracción y electroforesis de proteínas totales

Después de la eutanasia bajo anestesia se disecaron y se obtuvieron los hígados. Se mantuvieron a -70°C hasta el momento de su empleo. Se homogenizaron los tejidos en solución amortiguadora de lisis tiodiglicol (TDG) con un cóctel de inhibidores de proteínas (Tris-HCl 10 mM, ditiotretitol 1 mM, glicerol al 30%, tritón al 1%, azida de sodio 15 mM, EDTA 1 mM), en una relación amortiguadora de tejido a 4°C .

Las muestras homogenizadas se centrifugaron a 15,000 rpm, durante 15 min a 4°C y se separó el sobrenadante. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford et al (1976). Las proteínas obtenidas de los tejidos se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7.5% a 75 volts durante 2 h. Cada muestra se preparó con buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10 %, SDS 2 %, β -mercapto-etanol 5 %) en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 min para depositarse en los geles mencionados.

9.7. Western blot

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 20 volts, durante 1 h a una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas se bloquearon por 2 h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en Tris buffer (TBS) 1x.

Las membranas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal de conejo anti TGF- β 1 (Abcam). Las membranas se lavaron con TBS-Tween (TBS pH=7.4) más Tween 2 al 0.1 % 3 veces por 5 minutos. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (IgG-HRP) conjugado a peroxidasas en una concentración de 0.24 mg/ml (Santa Cruz). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol y un potenciador con sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario reaccionan generando una señal de quimioluminiscencia que se revela al exponer las membranas a placas radiográficas. Las placas fueron escaneadas y el análisis densitométrico se realizó empleando el programa para análisis de imagen AlphaEaseFC v3.2.1 (Alpha innotech Corp., San Leandro CA, USA).

9.8. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con una ANOVA de una vía y la prueba t de Student para realizar las comparaciones entre grupos. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó empleando el programa SPSS 12.0 para Windows (<http://www-142.ibm.com/software/products/es/es/spss-stats-standard>).

10. Resultados

10.1. Evaluación histológica e índice de Knodell

Los ratones en el grupo control se observaron con morfología hepática normal sin datos de respuesta inflamatoria u otro cambio notorio durante el estudio, figura 10 (a).

En el grupo expuesto a vanadio por 6 semanas se observaron focos inflamatorios difusos, figura 10 (b). En el grupo tratado con CCl_4 por 6 semanas se observó inflamación difusa intensa 10(c); con respecto al grupo expuesto a la administración de vanadio y CCl_4 , el patrón observado fue de focos inflamatorios difusos con pequeños focos de inflamación difusa, esto fue significativamente menor que en el grupo expuesto únicamente a CCl_4 , $p < 0.05$. Por otro lado, el grupo expuesto a CCl_4 presentó datos de necrosis, degeneración intralobulillar e inflamación difusa, que es el patrón de daño esperado en este modelo, figura 11.

Con respecto al grupo expuesto con vanadio y al grupo expuesto a vanadio y CCl_4 , se observó la presencia de hepatocitos con meganúcleos y binucleación en mayor número que el grupo control, así como del grupo tratado con CCl_4 , lo cual fue significativo como se observa en la figura 12. El tamaño de los núcleos hepáticos en el grupo control es de 7-10 μm . En los grupos expuestos a vanadio y al grupo expuesto a vanadio y CCl_4 los núcleos alcanzaron un tamaño de 20-30 μm de diámetro, lo que fue significativo ($p < 0.05$) comparado con los grupos control y tratado con CCl_4 , como se muestra en la figura 12. Con respecto a la presencia de hepatocitos binucleados estos se presentaron en el grupo tratado con vanadio y en el grupo tratado con vanadio y CCl_4 , lo cual fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control ($p < 0.05$), figura 13 y figura 14, estos datos ya fueron publicados por nuestro grupo de estudio⁶¹.

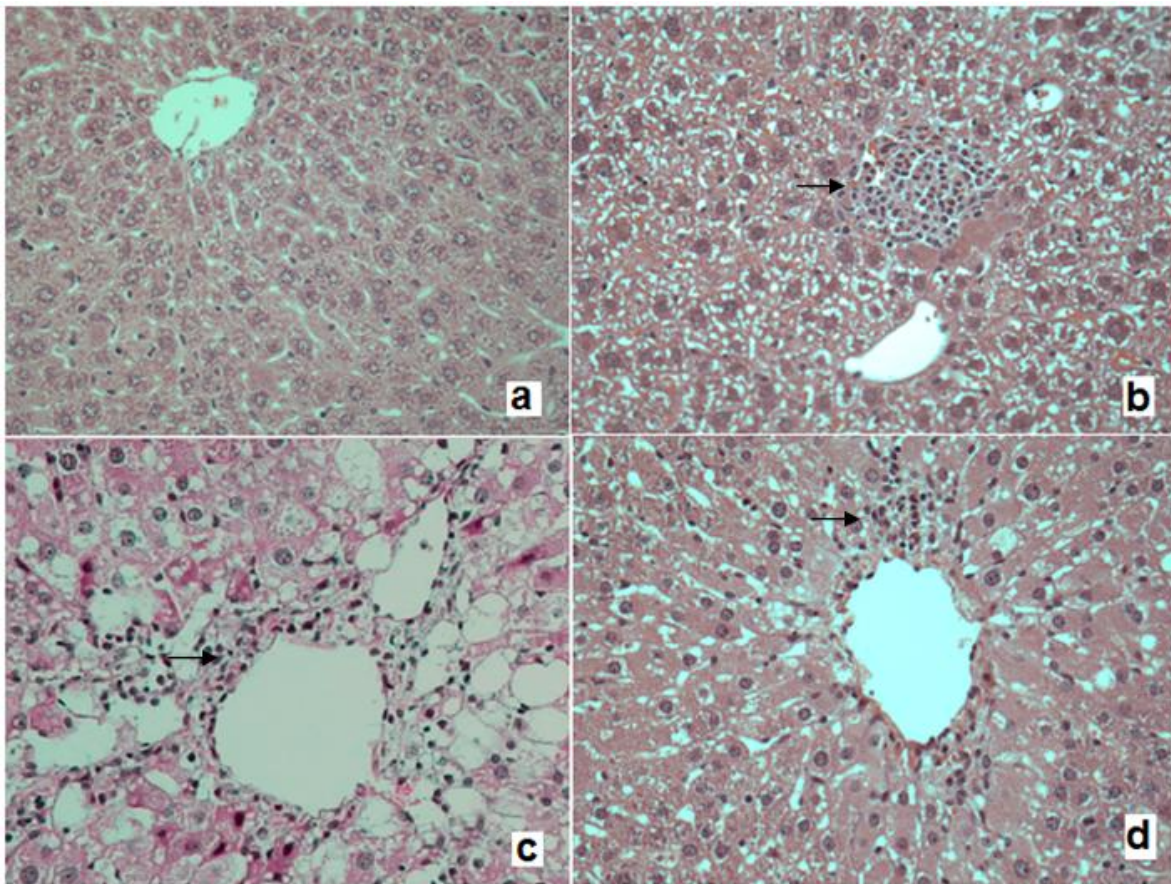


Figura 10. Se muestran los cortes histológicos de los diferentes grupos. (a) Grupo control. Se observa la histología normal y sin alteraciones de la glándula hepática. (b) Grupo expuesto a vanadio. Se observa un foco inflamatorio (flecha). (c) Grupo tratado con CCl_4 . Se observa necrosis, degeneración intralobulillar e infiltrado inflamatorio difuso (flecha). (d) Grupo tratado con la exposición de vanadio y CCl_4 . Se observa la conservación de la histología del parénquima hepático, el infiltrado difuso es leve, se observa un foco inflamatorio cerca de la vena central (flecha). Tinción con hematoxilina y eosina. Todas las imágenes a 40x.

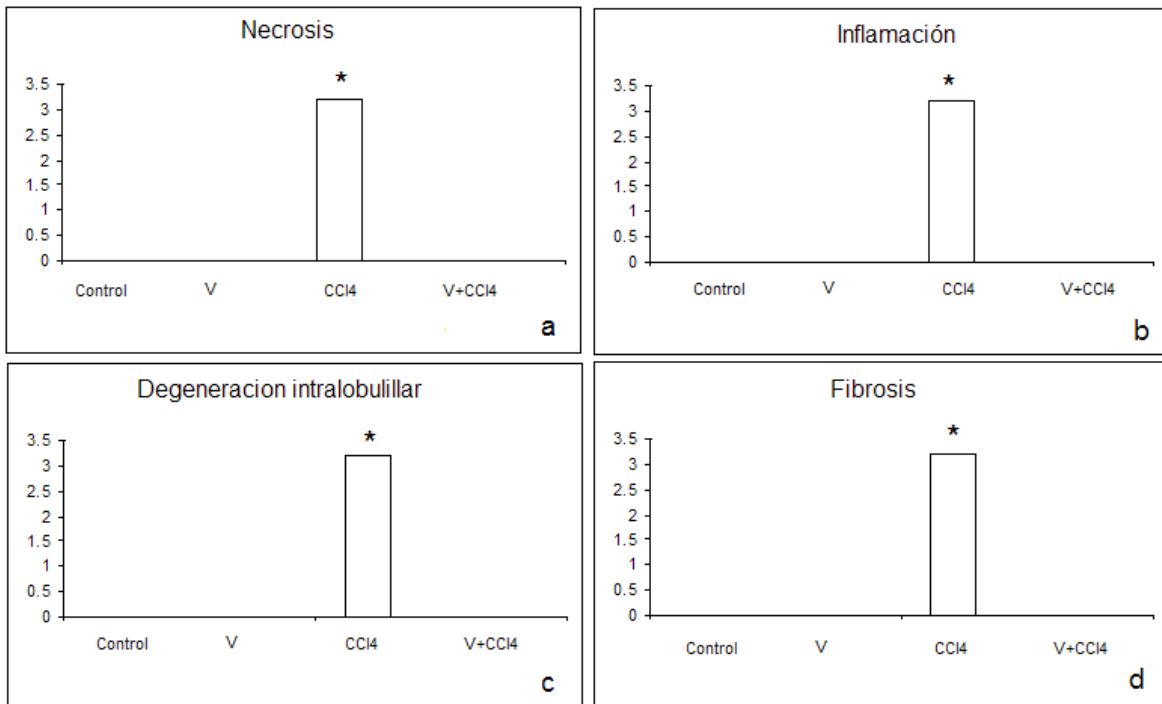


Figura 11. Análisis estadístico del índice de Knodell. Se muestran las calificaciones obtenidas de los diferentes parámetros medidos por el índice de Knodell, lo cuales fueron significativamente mayores comparados a los demás grupos. * $p < 0.05$. ANOVA. $n = 10$ ratones.

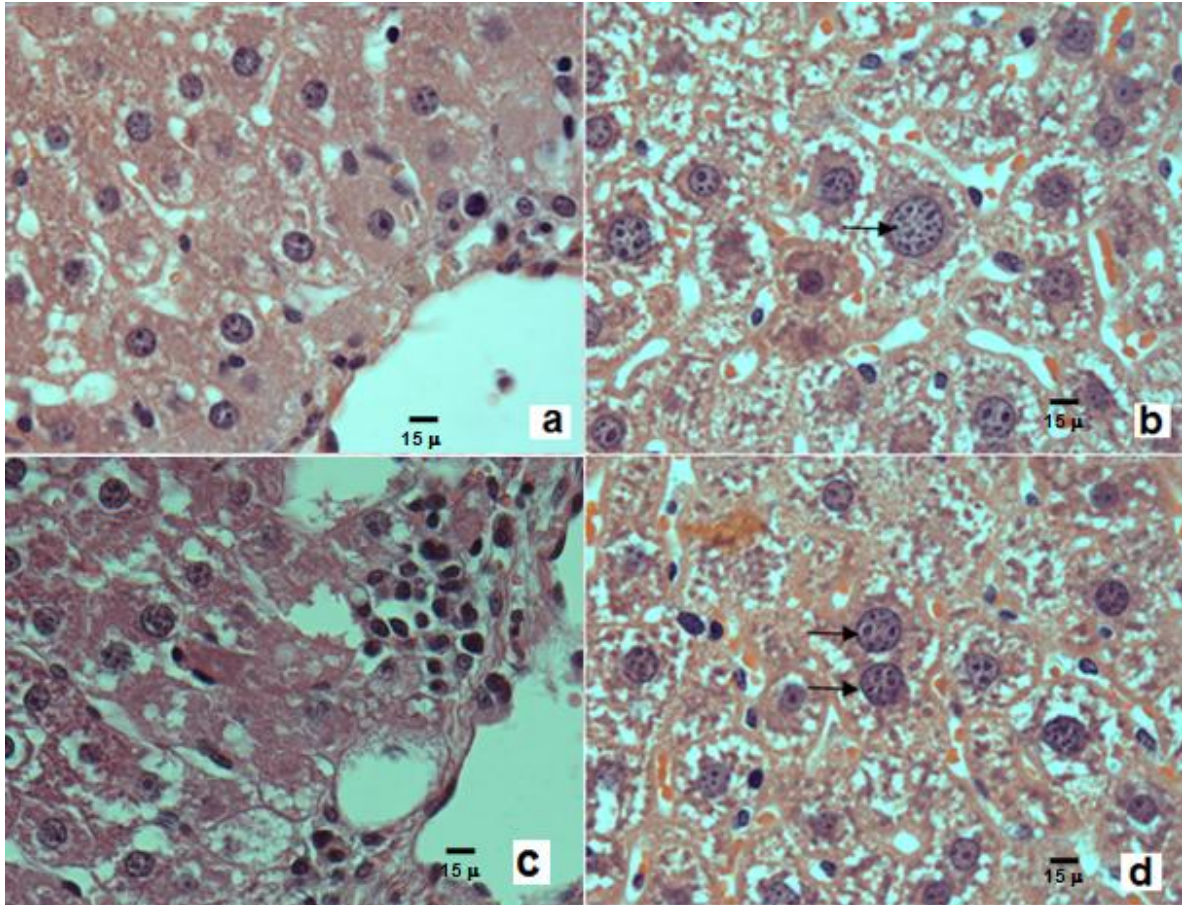


Figura 12. Meganúcleos de hepatocitos. (a) Grupo Control. Se muestran hepatocitos de tamaño normal. (b) Grupo expuesto a vanadio. Se observa la presencia de un meganúcleo (flecha). (c) Grupo tratado con CCl_4 . No se observa la presencia de meganúcleos. (d) Grupo expuesto a vanadio y CCl_4 . Se observa la presencia de meganúcleos. Los meganúcleos se indican con una flecha. Tinción con hematoxilina y eosina. Las fotografías se presentan con un aumento de 40x.

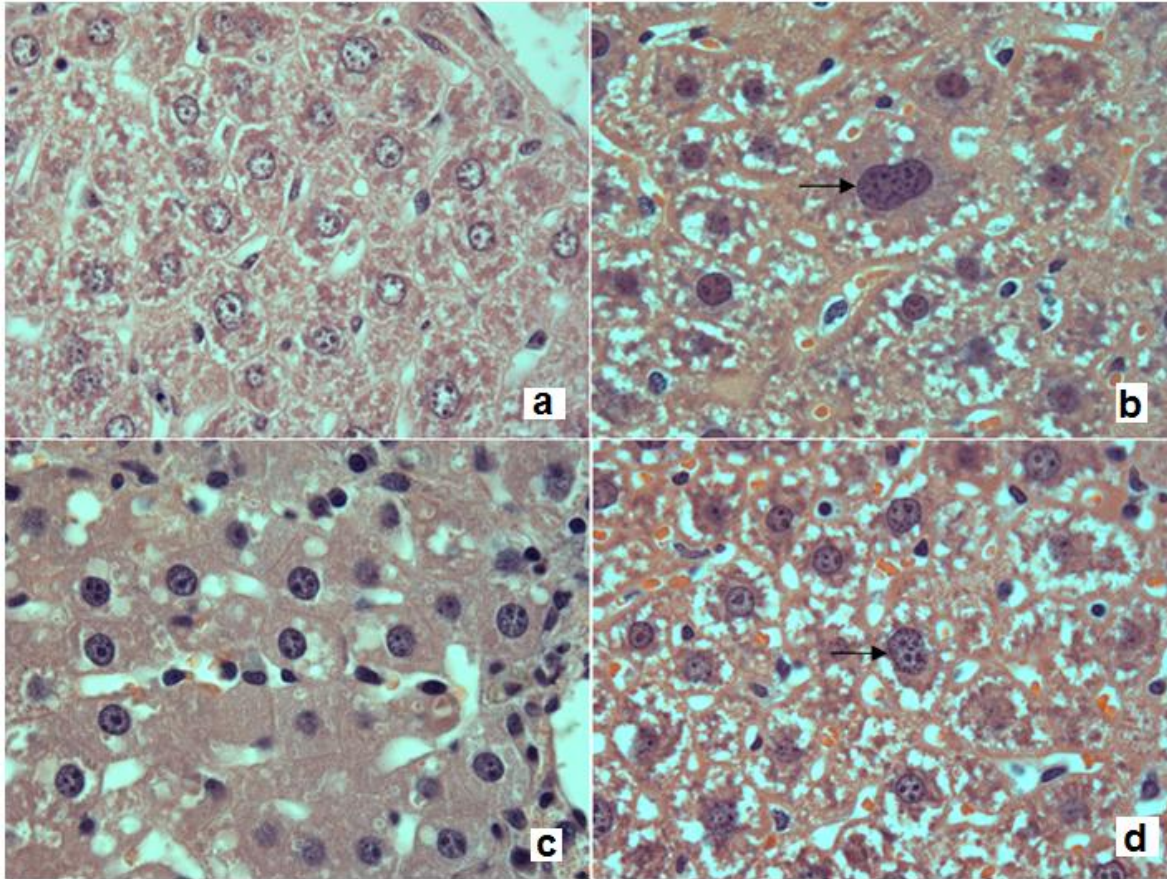


Figura 13. Hepatocitos binucleados. (a) Grupo Control. Se muestra los núcleos de los hepatocitos control (b) Grupo expuesto a vanadio. Se observa la presencia de hepatocitos binucleados (flecha). (c) Grupo tratado con CCl_4 . La presencia de hepatocitos binucleados es mínima. (d) Grupo expuesto a vanadio y CCl_4 . Se observa la presencia de hepatocitos binucleados. Los hepatocitos binucleados se indican con una flecha. Tinción con hematoxilina y eosina. Las fotografías se presentan con un aumento de 40x.

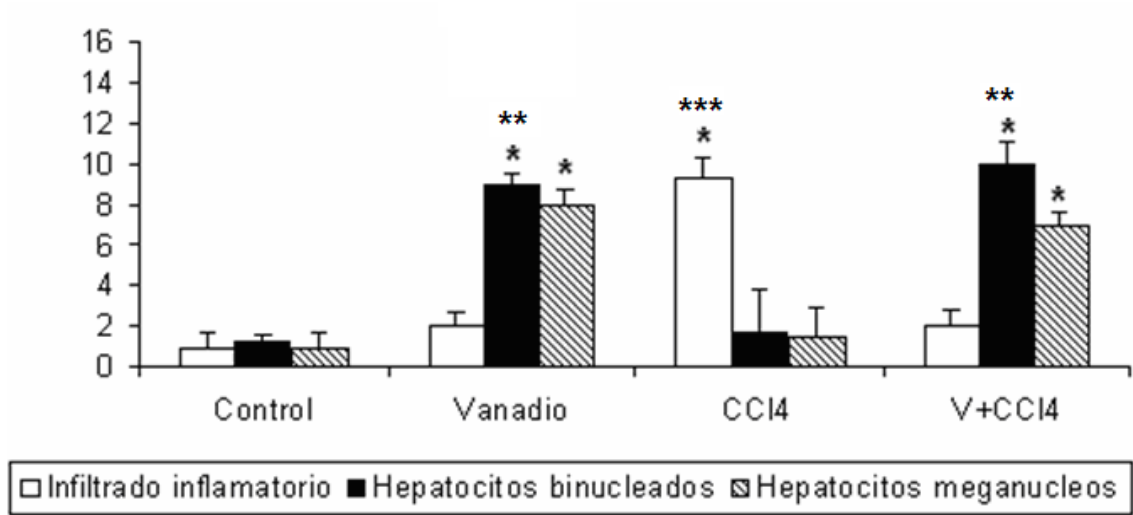


Figura 14. Se muestra el porcentaje de las alteraciones histológicas encontradas en los grupos tratados. *Las diferencias se compararon contra el grupo control. ** Los hepatocitos binucleados fueron mayores con respecto a los demás grupos excepto el grupo de CCl₄, *** El infiltrado inflamatorio fue mayor en el grupo expuesto a CCl₄, con respecto a los demás grupos *p<0.05 **p<0.05, ***p<0.05. ANOVA, n=10 ratones por grupo.

La fibrosis hepática, que se evaluó con la tinción de Masson, en el grupo control se observó la coloración azul, alrededor de la vena central, característica normal en los vasos sanguíneos y no se observa datos de fibrosis. Con respecto al grupo expuesto a vanadio no se observaron datos de fibrosis hepática, en el grupo tratado con CCl_4 , se observa fibrosis hepática con expansión portal (flecha) y en el grupo expuesto a vanadio y CCl_4 se observa fibrosis mínima y difusa, la cual no es valorable por la escala de Knodell, figura 11. En la evaluación estadística, se observa una diferencia significativa en a la fibrosis hepática observada en el grupo tratado con CCl_4 , con respecto al resto de los grupos figura 11. En la figura 15 se observan los cambios histológicos.

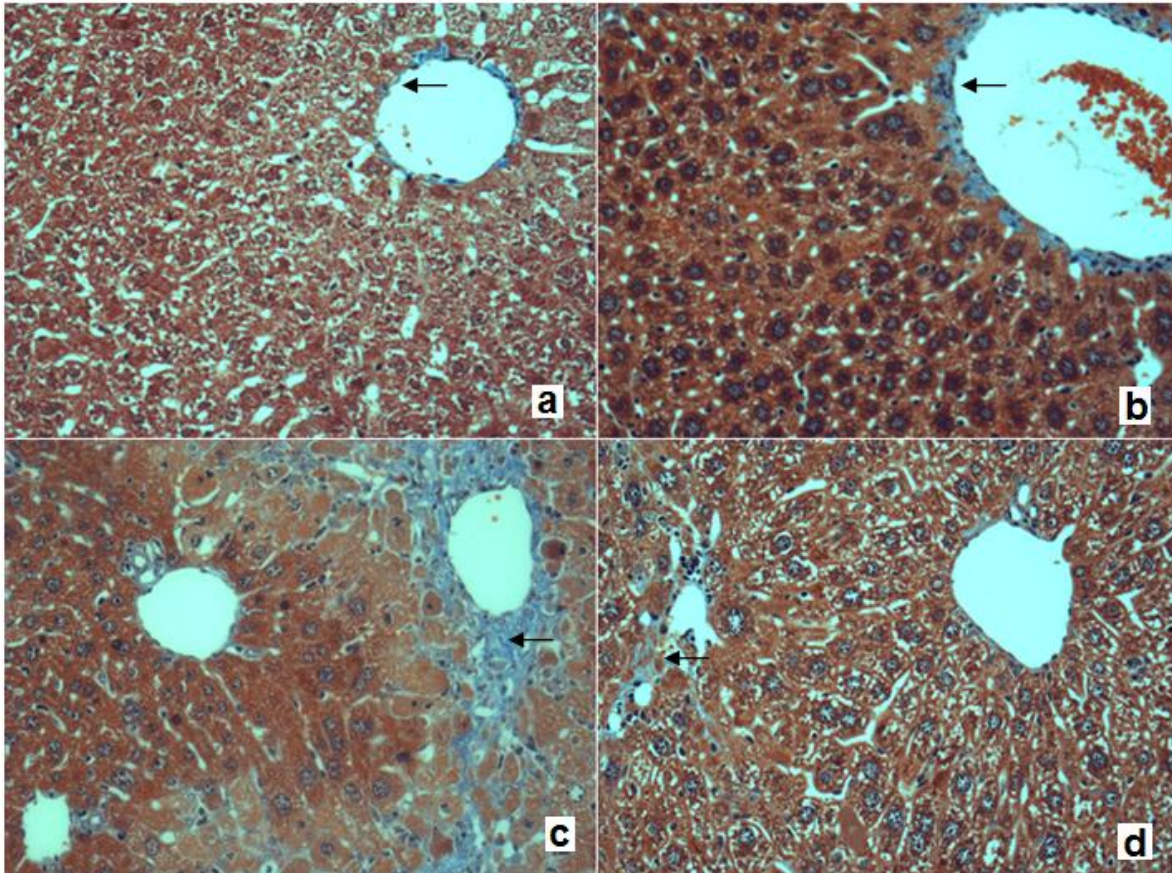
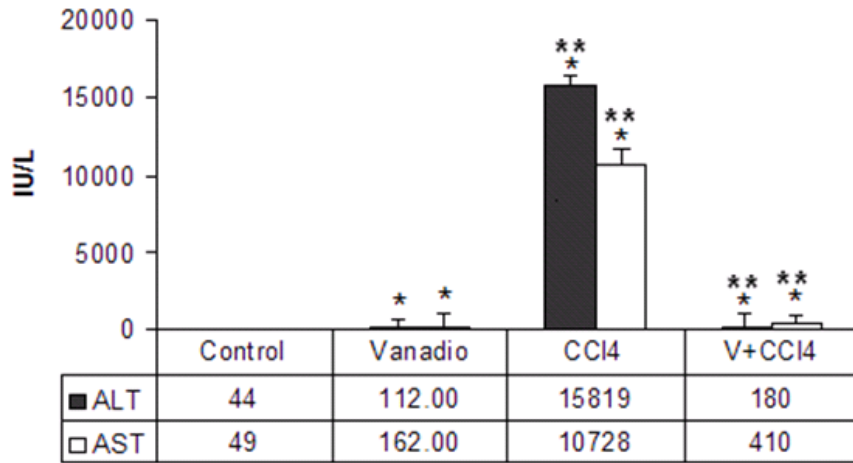


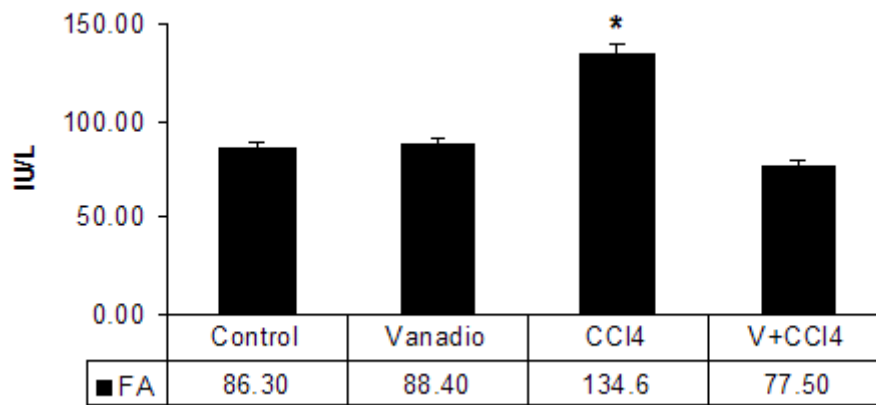
Figura 15. Fibrosis hepática. (a) Grupo control. Se observa la coloración azul, alrededor de la vena central, no hay datos de fibrosis hepática. (b) Grupo expuesto a vanadio. No hay datos de fibrosis hepática en el parénquima hepático. (c) Grupo expuesto a CCl_4 . Se observa fibrosis hepática con expansión portal. (d) Grupo expuesto a vanadio y CCl_4 . Se observa la presencia de fibrosis en poca cantidad en el parénquima hepático. Flecha indica la fibrosis hepática. Tinción de Masson. Las fotografías se presentan con un aumento de 40x.

10.2. Pruebas de funcionamiento hepático

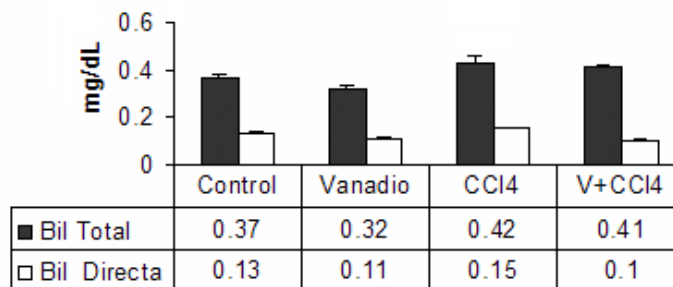
Las pruebas bioquímicas se realizaron con el suero de los ratones de los diferentes grupos tratados. En las gráficas se muestra como ALT, AST y la FA se incrementaron significativamente en el grupo tratado con CCl₄, con respecto a los demás grupos, comportamiento esperado en este modelo, no así las proteínas totales (PT) y la albumina. El grupo expuesto a vanadio y al grupo expuesto a vanadio y CCl₄ fue significativamente mayor la elevación de ALT y AST en comparación al grupo control. En el grupo expuesto a vanadio y CCl₄, el incremento de ALT y AST fue significativamente menor que en el grupo tratado con CCl₄. La cuantificación de las bilirrubinas no se encontraron alteradas, ni la determinación de protrombina, en los diferentes grupo de tratamiento, como se observa en la figura 16, cabe mencionar que todos los rangos se salieron del límite con respecto al grupo control, pero no alcanzaron los niveles, ni el grado de daño provocado por el CCl₄.



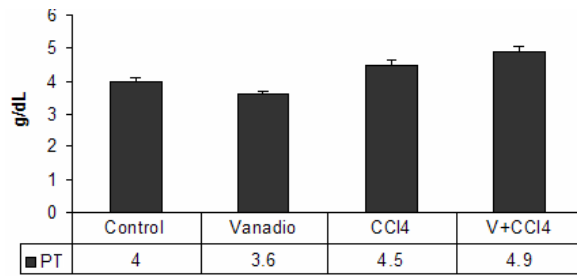
a



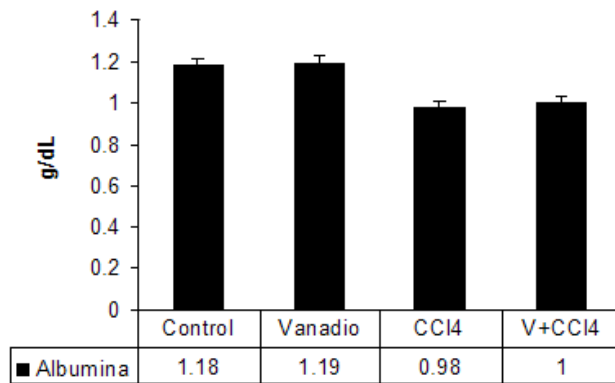
b



c



d



e

Figura 16. Evaluación de las pruebas de funcionamiento hepático (PFH). En la figura (a) y (b) se muestran los cambios significativos de ALT y AST, con respecto al grupo expuesto a vanadio y CCl₄ y al grupo de vanadio. *p<0.05 con respecto al grupo control, **p<0.05, con respecto a los demás grupos, + p<0.05 con respecto a los demás grupos, n=10. ANOVA.

10.3. Determinación del daño por estrés nitrérgico y lipoperoxidación lipídica

La determinación de daño por estrés oxidante se realizó con la determinación por inmunohistoquímica de nitrotirosina y 4-hidroxinonal. En la figura 17 se muestran los cambios en los grupos expuestos. En el grupo control la presencia de 4-hidroxinonal es mínima, con respecto al grupo expuesto a vanadio. Se observó la presencia del 4 hidroxinonal alrededor de los hepatocitos que rodean la vena central, así mismo observamos la presencia de meganúcleos y hepatocitos binucleados, figura 17a. Con respecto al grupo tratado con CCl₄, se observa un mayor incremento de la marca de hidroxinonal cubriendo la mayoría del parénquima hepático, esto fue significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo expuesto a vanadio y CCl₄. La presencia del 4-hidroxinonal es parecido al patrón del grupo expuesto a vanadio. En la figura 18, se muestra las evaluaciones y comparativas en los grupos tratados.

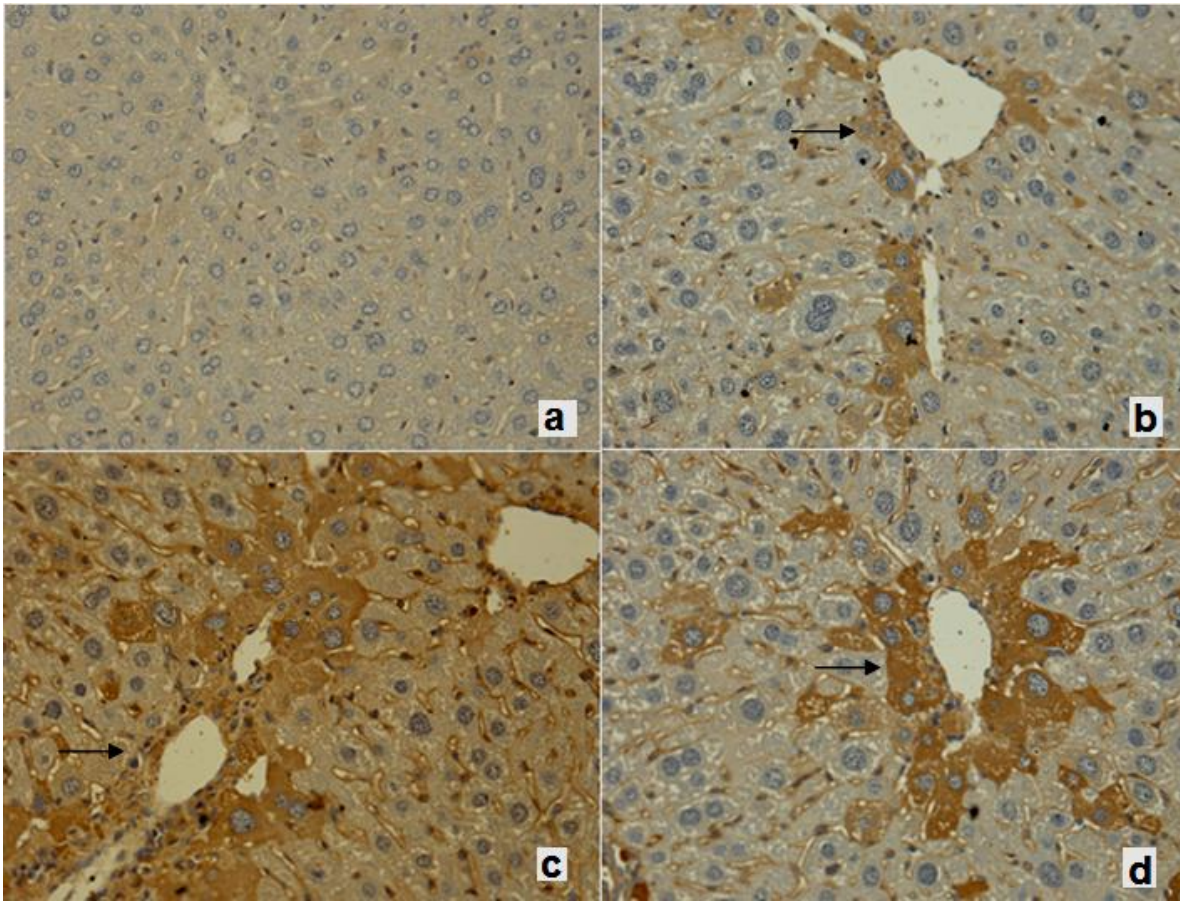


Figura 17. Inmunohistoquímica para 4-hidroxinonenal. (a) Grupo control. Se observa la marca basal en el grupo control, (coloración café, con un tono más intenso). (b) Grupo expuesto a vanadio. Se observa la marca positiva en color café, alrededor de la vena central (flecha) (c) Grupo tratado con CCl_4 (flecha). Se observa una marca más intensa y mayormente difuminada en el parénquima hepático (flecha) (d) Grupo expuesto a vanadio y CCl_4 . Se observa la marca alrededor de la vena central, el patrón de la localización de la marca es parecido al grupo expuesto a vanadio (flecha). Aumento 40x.

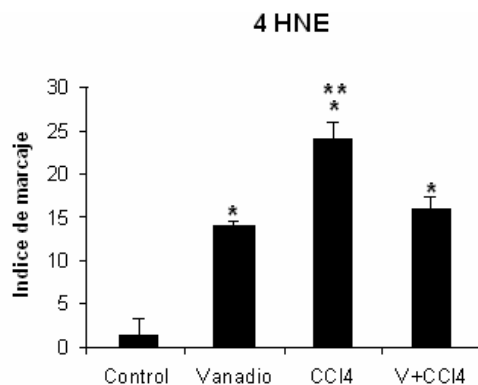


Figura 18. Índice de marcaje para 4-hidroxinonenal. Se observa como en el grupo tratado con CCl₄, fue significativamente mayor, **p<0.05, comparado con los grupos control, vanadio y al grupo expuesto a vanadio más CCl₄. En el grupo expuesto a vanadio y al grupo expuesto a vanadio más CCl₄ fue menor la marca, con respecto al grupo tratado con CCl₄, *p<0.05 n=10 ratones. ANOVA.

La evaluación del estrés nitrérgico se realizó con el marcaje para inmunohistoquímica para nitrotirosina. En el grupo control no hay marca, en el grupo expuesto a vanadio la marca para nitrotirosina se encontró alrededor de la vena central. En el grupo tratado con CCl₄, se observó un incremento de la marca de nitrotirosina, lo que fue estadísticamente significativo, con respecto al grupo expuesto y al grupo expuesto a vanadio y CCl₄. La marca positiva de nitrotirosina para el grupo expuesto al grupo expuesto vanadio y CCl₄ el patrón es parecido al del grupo expuesto a vanadio. En la figura 20, se muestra las evaluaciones comparativas en los grupos tratados.

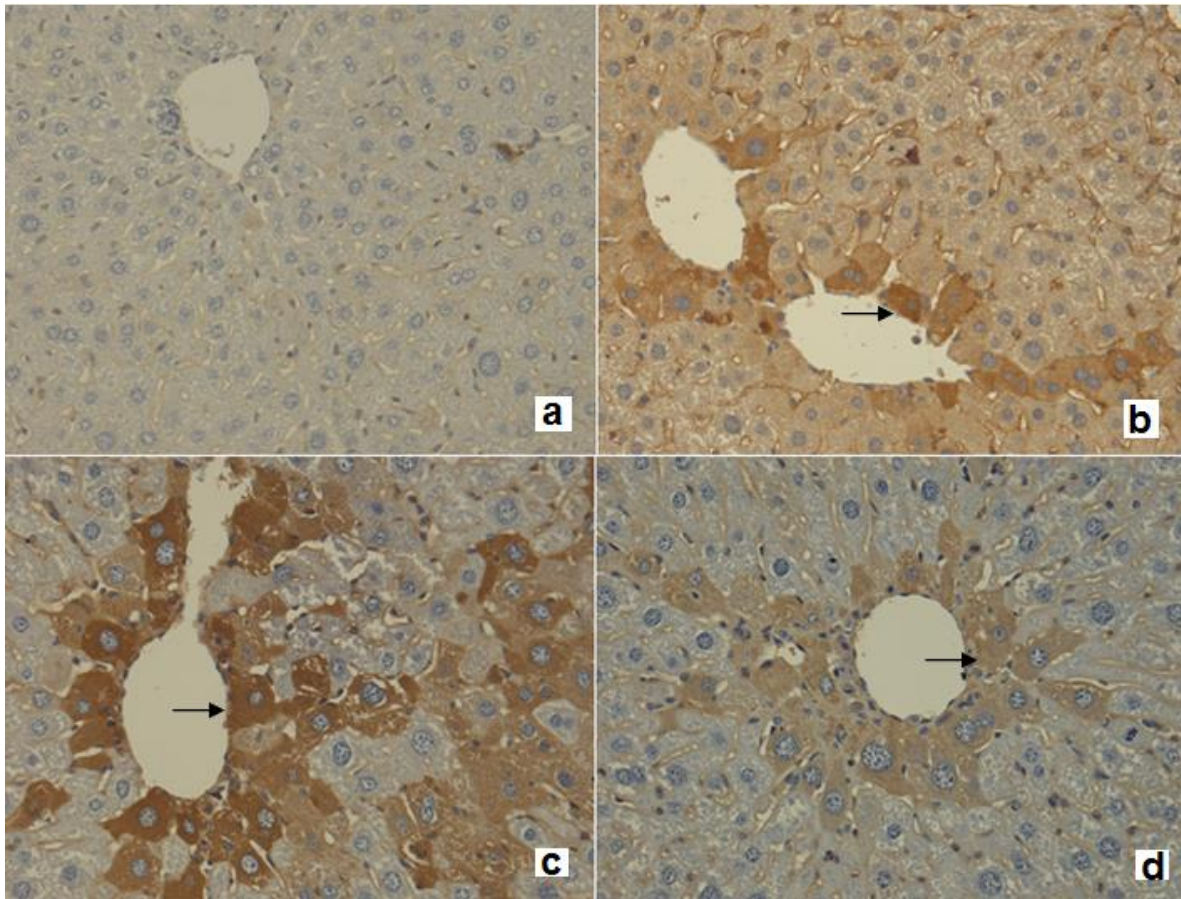


Figura 19. Inmunohistoquímica para nitrotirosina. (a). Grupo Control. Se encuentra ausencia de marca para nitrotirosina. (b). Grupo expuesto a vanadio. Se observa marca positiva para nitrotirosina (flecha) (c) Grupo tratado con CCl_4 . Se observa marca positiva para nitrotirosina con mayor intensidad (flecha) (d) Grupo expuesto a vanadio y CCl_4 . Se observa marca positiva para nitrotirosina alrededor de la vena central, la marca es de menor intensidad comparada con el grupo tratado con CCl_4 (flecha). Las fotografías se presentan con un aumento de 40x.

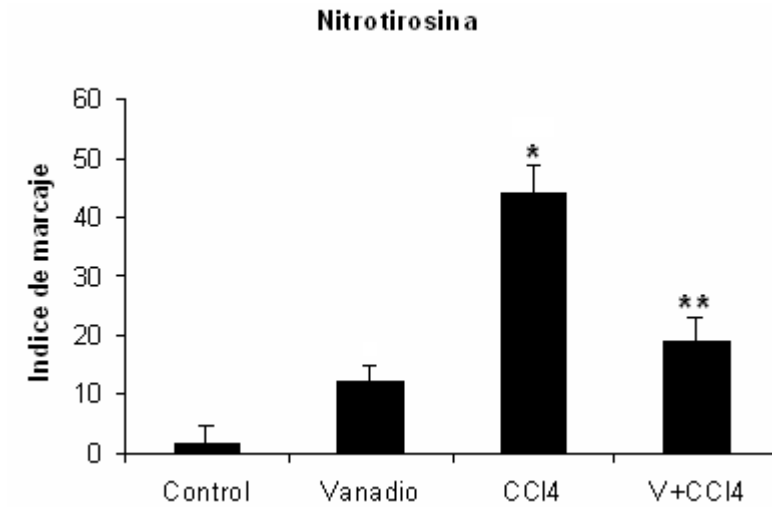


Figura 20. Índice de marcaje para nitrotirosina. Se observa una diferencia significativa para el grupo tratado con CCl₄, *p<0.05, comparado con los demás grupos. El grupo expuesto a vanadio y al grupo expuesto a vanadio mas CCl₄, la cantidad de marca positiva fue significativamente menor que en el grupo expuesto a CCl₄, **p<0.05. ANOVA. n= 10 ratones.

10.4. Determinación de alfa-actina de músculo liso por inmunohistoquímica

La identificación de las células estelares activadas se determinó con el anticuerpo anti-alfa actina de músculo liso, que marca la activación de las células estelares, como una respuesta de reparación al daño hepático, además de que estas células son las que producen la mayor cantidad de tejido cicatrizal, figura 21(c). Se observa que en el grupo control, figura 2(a), la marca para estas células es negativa, así como fue en el grupo expuesto a vanadio, figura 21(b). Como era de esperarse en el grupo expuesto a CCl₄, la marca fue positiva para células estelares activas, figura 21(c). Por último, en el grupo expuesto a vanadio y CCl₄ se observó que también hubo marca positiva para las células estelares activadas, aunque en el análisis comparativo el número de estas es menor que el grupo expuesto a CCl₄, figura 22.

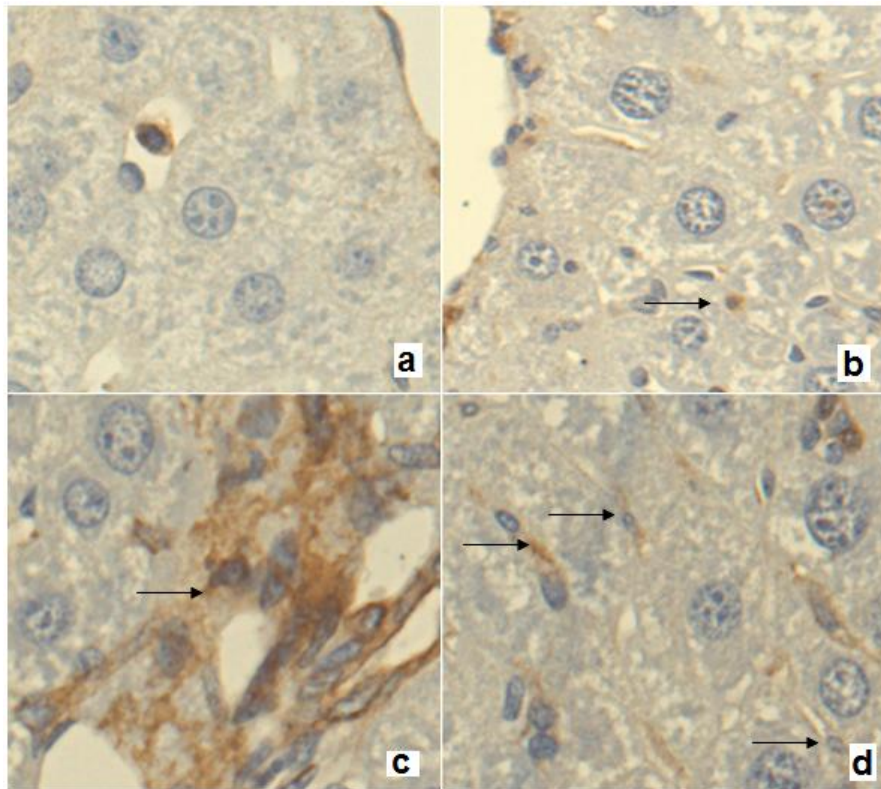


Figura 21. Inmunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso. (a) Grupo control. Se observa la ausencia de marca positiva para alfa-actina de músculo liso. (b) Grupo expuesto a vanadio. Se observa también ausencia de marca para alfa-actina de músculo liso. Solo se observaron células positivas de forma aislada (c) Grupo tratado con CCl_4 . Se observa la marca positiva para alfa actina de músculo liso, e identifica las células estelares activadas. (d) Grupo expuesto a vanadio y CCl_4 . Se observa marca positiva para alfa-actina de músculo liso. Se observa que las células estelares activadas no se encuentran apiñonadas como en el grupo expuesto a CCl_4 . La flecha indica las células estelares activadas. Las fotografías se presentan con un aumento de 100x

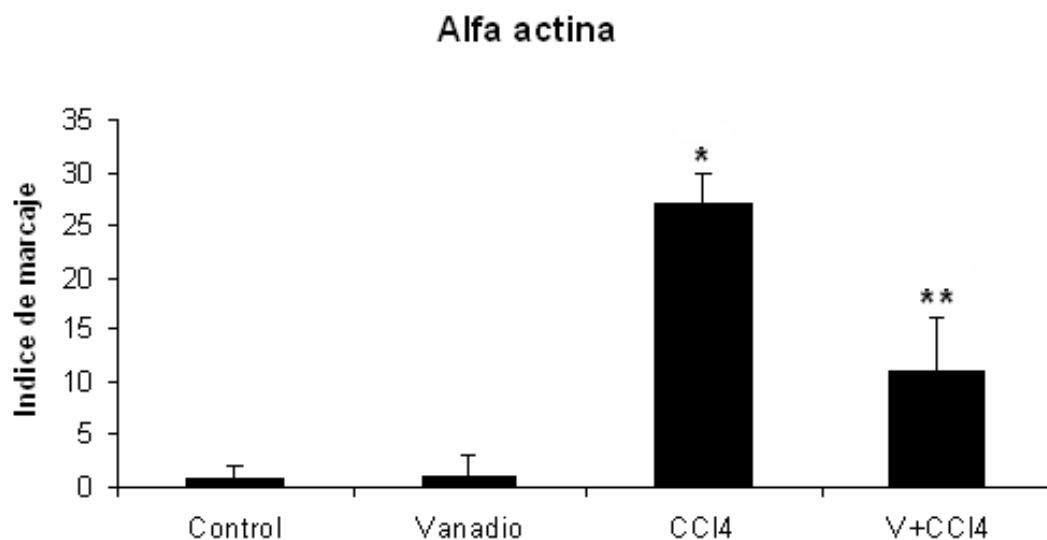
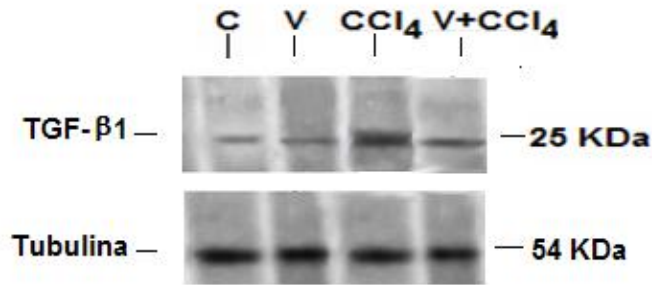


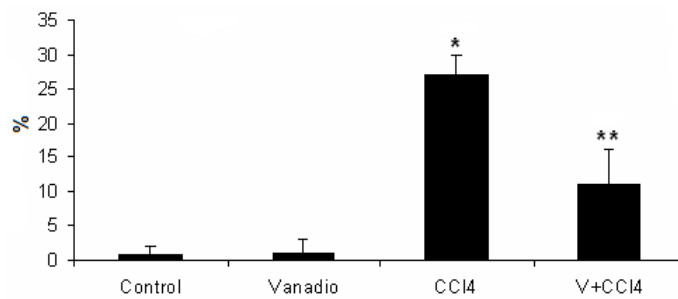
Figura 22. Índice de marcaje para alfa actina de músculo liso. Se observa que en el grupo expuesto a CCl₄, el número de células estelares activas es mayor * $p < 0.05$ que en los demás grupos. Con respecto al grupo expuesto a vanadio y CCl₄, el número de células estelares fue significativamente menor con respecto al grupo tratado con CCl₄, ** $p < 0.05$, $n = 10$, ANOVA.

10.5. Determinación del contenido de TGF- β 1

La detección del TGF- β 1 en las muestras de hígado se observó como una banda de 25 kDa y estuvo regulada a la alta en el grupo tratado con CCl₄, * $p < 0.05$ con respecto a los demás grupos y fue significativamente menor en el grupo expuesto a vanadio y CCl₄ con respecto al grupo tratado con CCl₄, tal como se observa en la figura 23.



(a)



(b)

Figura 23. Western blot para TGF- β 1. (a) Se presenta el western blot para TGF- β 1. (b). Se muestra el análisis estadístico de la determinación de TGF- β 1, se observa un incremento significativo en el grupo expuesto a CCl₄, * $p < 0.05$ con respecto a los demás grupos. Con respecto al grupo expuesto a vanadio y CCl₄, el contenido de TGF- β 1 fue significativamente menor con respecto al grupo tratado con CCl₄, ** $p < 0.05$. ANOVA, $n = 10$.

11. Discusión

La cicatrización o fibrosis del hígado es el resultado del daño hepático crónico de cualquier etiología. Los tratamientos utilizados en la actualidad se han enfocado en el manejo de las complicaciones, tales como ascitis y sangrado, sin embargo hasta la fecha esto no ha tenido impacto sobre la prevalencia de la enfermedad y se aplican en forma tardía, una vez que el daño tisular es irreversible. El objetivo de nuestro estudio es prevenir el daño hepático y el desarrollo de fibrosis hepática, con la administración de pentóxido de vanadio, el cual ha demostrado tener efectos benéficos en la salud humana y en el caso del hígado sobre tumores hepáticos en modelos experimentales.

De este modo se expusieron ratones a vanadio, a CCl₄ y a la administración conjunta de vanadio y CCl₄, de los que se obtuvieron los siguientes resultados.

Los ratones expuestos a vanadio revelaron daño por estrés oxidante, mediado por lipoperoxidación, así como la nitración de las proteínas. Resultados que concuerdan con otros autores^{54, 56-57}. Además llama la atención que en el grupo expuesto a vanadio se encontró un incremento significativo de hepatocitos con meganúcleos y binucleación hepática, hallazgos no reportados en la bibliografía, por la exposición a vanadio.

La presencia de meganúcleos en hepatocitos es reportada como una respuesta neoplásica o adaptación al daño tisular hepático, como lo demuestra la exposición del hígado al alcaloide pirrolizidina, en este trabajo el alcaloide no indujo cáncer hepático⁶².

En nuestro estudio, después de la exposición a vanadio por 6 semanas también se observaron datos de hipertrofia y regeneración hepática, lo que indicaría un incremento en el metabolismo de xenobióticos por parte de la glándula hepática, además tampoco se observó la inducción de neoplasia.

De esta manera podríamos inferir que el vanadio es capaz de inducir una respuesta citoprotectora e hipertrófica en el hígado, de forma similar a los estudios en el que expusieron al hígado al alcaloide pirrolizidina⁶². Aunque faltaría determinar qué factores de crecimiento apoyan esta respuesta histológica. Por ejemplo, una de los más importantes es el factor de crecimiento hepático (HGF)⁶³, es un factor que participa en la regeneración hepática. Otros hechos que podrían apoyar estos datos es que el vanadio es utilizado como un agente anabólico para el incremento de la masa muscular y rendimiento físico^{48, 57}, en suplementos deportivos, mediado por un incremento en la sensibilidad de la insulina⁴⁸, efectos que también podrían mediar la protección hepática.

Otro hallazgo en la evaluación histológica en el grupo expuesto a vanadio fue la presencia de focos inflamatorios difusos, que nos indica zonas de daño y acumulación de metal, en la que los macrófagos se concentran para eliminar y reparar las lesiones⁴⁴. En la evaluación de la fibrosis hepática en el grupo expuesto a vanadio, no se encontró fibrosis hepática, por lo que no calificó para ninguna de las variables que mide el índice de Knodell⁴⁴.

Con respecto al efecto del vanadio sobre las células estelares hepáticas, el vanadio indujo la activación de las células estelares quiescentes. Esto obedece a la liberación de radicales

libres por parte del vanadio, durante la peroxidación lipídica⁴. Pero en nuestro modelo el estímulo y el tiempo de exposición al vanadio no fueron suficientes para desencadenar una respuesta fibrótica.

La medición de TGF- β 1 por western blot en el grupo expuesto a vanadio, se incrementó con respecto al grupo control pero no fue estadísticamente significativo, además el incremento no fue mayor comparado con el grupo tratado con CCl₄ y tampoco hubo un incremento significativo en el grupo expuesto a vanadio y CCl₄. Cabe mencionar que la presencia del TGF- β 1 en el hígado está implicada en los procesos de reparación, en la síntesis e incorporación de proteínas de matriz extracelular, que permite la cicatrización hepática. Además de que el TGF- β 1 es un mediador involucrado en la activación de las células estelares, que al recibir una retroalimentación positiva por parte de los macrófagos y hepatocitos lesionados, juega un papel importante en el desarrollo de la fibrosis hepática^{26, 64}, pero en nuestro modelo de exposición a vanadio por 6 semanas no se incrementó lo suficiente para que el grupo de vanadio desarrollara fibrosis hepática.

Con respecto a las PFH en el grupo expuesto a vanadio, el incremento fue significativo en ALT, AST y FA, comparado con el grupo control e inferior al grupo expuesto con CCl₄, pero en la administración de vanadio y CCl₄, en donde se esperaría un incremento en el daño bioquímico celular, la presencia de estas enzimas de daño hepático no fue aditivo.

En el grupo tratado con CCl₄ el modelo funcionó como se esperaba, al producir daño hepático y fibrosis hepática a las 6 semanas de exposición³³. El mecanismo por el cual el

CCl_4 induce daño a los lípidos de membrana, es que al ser metabolizado en el retículo endoplásmico liso, éste es transformado en triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$), un radical altamente reactivo y que es la base de los efectos tóxicos sobre la glándula hepática. La producción de este radical altamente reactivo por parte del CCl_4 , es capaz de iniciar reacciones en cadena de lipoperoxidación, abstrayendo un hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados³³. La peroxidación de los lípidos de membrana, genera un daño severo en los hepatocitos y juega un papel importante en el desarrollo de la fibrosis hepática. Asimismo, la peroxidación lipídica induce el daño a proteínas³⁵, tal como lo vimos con la marca positiva para nitrotirosina en nuestro modelo expuesto a vanadio.

Es importante señalar que este modelo se utilizó por el tipo de daño que genera el CCl_4 en el hígado, ya que semeja el estado oxidante que se produce en la mayoría de las enfermedades crónicas del hígado³⁵. En general estas enfermedades se acompañan de un debilitamiento en su sistema antioxidante y la acumulación de lípidos peroxidados en su parénquima, como es el caso de la esteohepatitis no alcohólica y que terminan en fibrosis hepática³³. Por lo que el daño por peroxidación lipídica es un factor importante que induce inflamación crónica y fibrosis hepática. La fibrosis en este modelo es inducida por el daño en los hepatocitos, lo que lleva al reclutamiento de células inflamatorias y plaquetas, activación de las células estelares y la subsecuente liberación de citocinas de daño hepático³⁶. Tal como lo validamos en nuestro modelo y obtener puntuaciones altas en el índice de Knodell.

Lo que resalta de los resultados de nuestro trabajo es que al evaluar el daño hepático y la fibrosis hepática, al administrarse de forma conjunta el vanadio y el CCl₄, se esperó un daño aditivo, pero la evidencia mostró lo opuesto. En la evaluación histológica se observó que después de 6 semanas de exposición de vanadio y CCl₄, el patrón de daño observado se asemejó al que se produjo con la exposición a vanadio solo, se observó un incremento significativo de hepatocitos con meganúcleos, focos difusos inflamatorios y no se encontraron datos de necrosis hepática o degeneración intralobulillar y no hubo fibrosis hepática sólo en algunos campos de forma aislada, misma que no cumplió los criterios para ser calificada con el índice de Knodell.

Con respecto a las PFH en el grupo expuesto a vanadio y CCl₄, la concentración de ALT, AST y FA en suero, fueron mayores al grupo control, pero estadísticamente inferiores al grupo expuesto con CCl₄. Para el marcaje de daño hepático por lipoperoxidación y de nitración de proteínas, la marca fue estadísticamente menor comparada con el grupo expuesto a CCl₄. El TGF-β1 mostró un incremento significativamente mayor al grupo control, pero no fue mayor comparado con el de CCl₄. En lo que concierne al grupo expuesto a vanadio y CCl₄ en las células estelares hepáticas, se observó marca positiva pero esta no fue significativamente mayor al grupo expuesto a CCl₄, además de que no se encontraban apiñonadas en las aéreas de fibrosis como en el grupo de CCl₄. Estos resultados sugieren que el vanadio puede reducir el daño inducido por el CCl₄ y que puede tener un efecto antifibrótico.

Los efectos del vanadio sobre el modelo de fibrosis hepática por CCl₄, se podrían explicar por la capacidad del vanadio de inducir la liberación de especies reactivas de oxígeno^{54, 56-}

⁵⁷, como lo hemos observado en nuestro modelo. En este caso el vanadio indujo un estado oxidante que moduló la respuesta del hígado ante el daño provocado por el CCl₄.

Esto es porque las especies reactivas de oxígeno e incluso las especies reactivas de nitrógeno no son del todo negativas para la célula, si su producción es generada en ciertas condiciones de concentración y tiempo^{24, 65}. De hecho son varios los factores de crecimiento y citocinas que se generan a partir de la liberación de especies reactivas de oxígeno, como intermediarias en la señalización celular^{21, 66}, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y el factor de crecimiento hepático (HGF)⁶⁶. Este último, el HGF está involucrado en la hipertrofia y regeneración hepática, como respuesta al daño o la resección hepática⁶⁷. Por lo que se propondría como hipótesis que el vanadio induce este factor que le permite al hepatocito enfrentarse mejor a la agresión hepática provocada por el CCl₄. Esta propuesta la sustentan los datos obtenidos en nuestro estudio al observar un incremento en el número de meganúcleos hepáticos, así como de hepatocitos binucleados que apoyan esta propuesta de regeneración e hipertrofia hepática, como una respuesta a la exposición de vanadio como se describió en la exposición al alcaloide pirrolizidina aunque falta evaluar la secreción de HGF^{62, 67}.

Por lo que faltaría evaluar en nuestro modelo la liberación de factor de crecimiento hepático y si éste participa en la protección contra el CCl₄, lo que le daría al vanadio la posibilidad de proponer su aplicación como un agente terapéutico contra la fibrosis hepática.

Esta teoría también podría ser apoyada por los factores de transcripción que responden a las especies reactivas de oxígeno, entre los que podemos destacar a los factores AP1, NF-kB y Nrf2⁶⁸. En este sentido el AP1 regula los genes que codifican a la colágena, la ciclina D y las citocinas TGF- β 1, IL-8 y el TNF- α en el hígado y estos a su vez regulan los procesos de proliferación, reparación e inflamación hepática^{21, 68}.

El NF-kB es también regulado por las especies reactivas de oxígeno y éste es un factor de transcripción que se une al promotor del gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina k de las células B y es capaz de regular los fenómenos proliferativos y de apoptosis⁶⁶.

Otro factor también regulado por las especies reactivas de oxígeno y que necesitaríamos evaluar en futuros estudios es la inducción del factor Nrf2⁶⁹, que podría explicar los efectos antifibrogénicos del vanadio. La importancia del Nrf2 reside en su capacidad para controlar la expresión de varias proteínas de defensa anti-oxidante y de detoxificación⁷⁰. De hecho, se ha considerado como un factor clave en citoprotección en procesos de carcinogénesis, respuesta inflamatoria y neuroprotección⁷¹. Lo que explicaría los efectos de antiproliferativos del vanadio en los modelos de hepatocarcinoma y sus efectos en la fibrosis hepática, en nuestro trabajo.

12. Conclusiones

En este estudio demostramos que el vanadio tiene un efecto antifibrótico y que disminuye el daño en el modelo de fibrosis hepática por CCl₄. Además el vanadio induce en el hígado una respuesta de hipertrofia y regeneración hepática que le permite al hígado responder de una forma citoprotectora a la agresión inducida por el CCl₄.

13. Perspectivas

Evaluar el efecto del vanadio en un modelo de fibrosis y cirrosis hepática ya establecida.

Evaluar los mecanismos por los que el vanadio evita el daño y la fibrosis hepática.

Evaluar los diferentes compuestos de vanadio y su posible uso en la fibrosis hepática.

14. Referencias

1. Uribe M, Gutierrez-Grobe Y, Kobashi-Margain RA, Mendez-Sanchez N. Noninvasive markers of liver fibrosis in Latin America and Mexico. *Ann Hepatol* 2010;9 Suppl:43-8.
2. Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-Garza H. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol* 2009;15:280-8.
3. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.
4. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011;6:425-56.
5. Fallowfield JA. Therapeutic targets in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G709-15.
6. Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1346-55.
7. Bishayee A, Karmakar R, Mandal A, Kundu SN, Chatterjee M. Vanadium-mediated chemoprotection against chemical hepatocarcinogenesis in rats: haematological and histological characteristics. *Eur J Cancer Prev* 1997;6:58-70.
8. Bishayee A, Oinam S, Basu M, Chatterjee M. Vanadium chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinogenesis: probable involvement of representative hepatic phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes. *Breast Cancer Res Treat* 2000;63:133-45.
9. Chakraborty T, Samanta S, Ghosh B, Thirumoorthy N, Chatterjee M. Vanadium induces apoptosis and modulates the expressions of metallothionein, Ki-67 nuclear antigen, and p53 during 2-acetylaminofluorene-induced rat liver preneoplasia. *J Cell Biochem* 2005;94:744-62.
10. Chakraborty T, Swamy AH, Chatterjee A, Rana B, Shyamsundar A, Chatterjee M. Molecular basis of vanadium-mediated inhibition of hepatocellular preneoplasia during experimental hepatocarcinogenesis in rats. *J Cell Biochem* 2007;101:244-58.
11. Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci* 2010;55:560-78.
12. Macchiarelli G, Motta PM. The three-dimensional microstructure of the liver. A review by scanning electron microscopy. *Scan Electron Microsc* 1986:1019-38.
13. Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:437-51.
14. Mu YP, Ogawa T, Kawada N. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. *Lab Invest* 2010;90:245-56.
15. Pinzani M, Vizzutti F. Fibrosis and cirrhosis reversibility: clinical features and implications. *Clin Liver Dis* 2008;12:901-13, x.
16. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:1655-69.
17. Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, Miura M, Imai K, Mezaki Y. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future. *Cell Biol Int* 2010;34:1247-72.
18. Mansy SS, Elkhafif NA, Abelfatah AS, Yehia HA, Mostafa I. Hepatic stellate cells and fibrogenesis in hepatitis C virus infection: an ultrastructural insight. *Ultrastruct Pathol* 2010;34:62-7.

19. Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010;30:215-25.
20. Rombouts K, Marra F. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis* 2010;28:229-35.
21. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:173-9.
22. Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin Chim Acta* 2011;412:410-24.
23. Smathers RL, Galligan JJ, Stewart BJ, Petersen DR. Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease. *Chem Biol Interact* 2011;192:107-12.
24. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention. *J Surg Res* 2011;167:96-112.
25. Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2009;120:361-8.
26. Matsuzaki K. Modulation of TGF-beta signaling during progression of chronic liver diseases. *Front Biosci* 2009;14:2923-34.
27. Ruivard M. [Genetic iron overloads and hepatic insulin-resistance iron overload syndrome: an update]. *Rev Med Interne* 2009;30:35-42.
28. Stremmel W. [Pathogenesis of Wilson's disease]. *Z Gastroenterol* 1992;30:199-201.
29. Mailliard ME, Gollan JL. Metabolic liver disease in the young adult. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:307-22.
30. Ferenci P, Zollner G, Trauner M. Hepatic transport systems. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S105-12.
31. Fenoglio C, Boncompagni E, Fasola M, et al. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2005;60:259-68.
32. Tan HH, Fiel MI, Sun Q, et al. Kupffer cell activation by ambient air particulate matter exposure may exacerbate non-alcoholic fatty liver disease. *J Immunotoxicol* 2009;6:266-75.
33. Snowdon VK, Fallowfield JA. Models and mechanisms of fibrosis resolution. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:794-9.
34. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003;33:105-36.
35. Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol* 2007;45:43-50.
36. Rojkind M, Greenwel P. Animal models of liver fibrosis. *Adv Vet Sci Comp Med* 1993;37:333-55.
37. Horvath T, Par A, Bero T, Kadas I, Fabian C, Javor T. Correlation between biochemical tests, parameters of drug elimination and hepatic enzyme induction in chronic liver diseases. *Acta Med Hung* 1983;40:203-13.
38. Plebani M, Burlina A. Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin Biochem* 1991;24:219-39.
39. Ramaiah SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1551-7.
40. Brockmoller J, Roots I. Assessment of liver metabolic function. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1994;27:216-48.

41. Cappell MS, Schwartz MS, Biempica L. Clinical utility of liver biopsy in patients with serum antibodies to the human immunodeficiency virus. *Am J Med* 1990;88:123-30.
42. Stanciu A, Floarea-Strat A. [Knodell and Metavir scoring systems--advantages and limits]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2002;106:753-6.
43. Clichici S, Catoi C, Mocan T, et al. Non-invasive oxidative stress markers for liver fibrosis development in the evolution of toxic hepatitis. *Acta Physiol Hung* 2011;98:195-204.
44. Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994;20:349-55.
45. Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15 Suppl:D26-32.
46. Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol* 2009;8:283-91.
47. Gieling RG, Burt AD, Mann DA. Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms. *Clin Liver Dis* 2008;12:915-37, xi.
48. Badmaev V, Prakash S, Majeed M. Vanadium: a review of its potential role in the fight against diabetes. *J Altern Complement Med* 1999;5:273-91.
49. Sabbioni E, Kueera J, Pietra R, Vesterberg O. A critical review on normal concentrations of vanadium in human blood, serum, and urine. *Sci Total Environ* 1996;188:49-58.
50. Smith DM, Pickering RM, Lewith GT. A systematic review of vanadium oral supplements for glycaemic control in type 2 diabetes mellitus. *QJM* 2008;101:351-8.
51. Chen ZL, Owens G. Trends in speciation analysis of vanadium in environmental samples and biological fluids--a review. *Anal Chim Acta* 2008;607:1-14.
52. Assem FL, Levy LS. A review of current toxicological concerns on vanadium pentoxide and other vanadium compounds: gaps in knowledge and directions for future research. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009;12:289-306.
53. Zhao Y, Ye L, Liu H, et al. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. *J Inorg Biochem* 2010;104:371-8.
54. Soares SS, Martins H, Duarte RO, et al. Vanadium distribution, lipid peroxidation and oxidative stress markers upon decavanadate in vivo administration. *J Inorg Biochem* 2007;101:80-8.
55. Elberg G, Li J, Shechter Y. Vanadium activates or inhibits receptor and non-receptor protein tyrosine kinases in cell-free experiments, depending on its oxidation state. Possible role of endogenous vanadium in controlling cellular protein tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 1994;269:9521-7.
56. Barceloux DG. Vanadium. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;37:265-78.
57. Dafnis E, Sabatini S. Biochemistry and pathophysiology of vanadium. *Nephron* 1994;67:133-43.
58. Gutierrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrian-Garcia ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeno M, Ostrosky-Wegman P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:199-211.
59. Fortoul TI, Quan-Torres A, Sanchez I, et al. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch Environ Health* 2002;57:446-9.
60. Basak R, Chatterjee M. Combined supplementation of vanadium and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibit placental glutathione S-transferase positive foci in rat liver carcinogenesis. *Life Sci* 2000;68:217-31.

61. Fortoul TI, Rodriguez-Lara V, Gonzalez-Villalva A, et al. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:951043.
62. Jago MV. The development of the hepatic megalocytosis of chronic pyrrolizidine alkaloid poisoning. *Am J Pathol* 1969;56:405-21.
63. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995;9:1527-36.
64. Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:281-90.
65. Shukla R, Barve V, Padhye S, Bhonde R. Reduction of oxidative stress induced vanadium toxicity by complexing with a flavonoid, quercetin: a pragmatic therapeutic approach for diabetes. *Biometals* 2006;19:685-93.
66. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652-9.
67. Hoffman AL, Rosen HR, Ljubimova JU, et al. Hepatic regeneration: current concepts and clinical implications. *Semin Liver Dis* 1994;14:190-210.
68. Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatology* 1994;41:343-8.
69. Weng CJ, Chen MJ, Yeh CT, Yen GC. Hepatoprotection of quercetin against oxidative stress by induction of metallothionein expression through activating MAPK and PI3K pathways and enhancing Nrf2 DNA-binding activity. *N Biotechnol* 2011.
70. Kay HY, Kim YW, Ryu da H, Sung SH, Hwang SJ, Kim SG. Nrf2-mediated liver protection by sauchinone, an antioxidant lignan, from acetaminophen toxicity through the PKCdelta-GSK3beta pathway. *Br J Pharmacol* 2011;163:1653-65.
71. Sun LY, Bokov AF, Richardson A, Miller RA. Hepatic response to oxidative injury in long-lived Ames dwarf mice. *FASEB J* 2011;25:398-408.
72. Riveros-Rosas, H.; Pfeifer, G.D.; Lynam, D.R.; Pedroza, J.L.; Julián-Sánchez, A.; Canales, O. y Garfias, J. (1997). *Personal exposure to elements in Mexico City air*. *Sci. Total Environm.* 198: 79-96.

Hepatic megalocytosis due to vanadium inhalation: participation of oxidative stress

Toxicology and Industrial Health
000(00) 1–8
© The Author(s) 2011
Reprints and permission:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0748233711412424
tih.sagepub.com

Gumaro Cano-Gutiérrez¹, Sandra Acevedo-Nava¹,
Abel Santamaría², Mario Altamirano-Lozano³,
María Concepción Cano-Rodríguez⁴ and
Teresa I Fortoul¹

Abstract

The aim of this study was to evaluate the morphological changes, liver function test (LFT), and oxidative stress damage caused by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), in mice exposed to vanadium via inhalation. Male CD-1 mice were exposed to vanadium pentoxide (V₂O₅) via inhalation (0.02 M), 1 hour twice a week for 6 weeks. At the end of the protocol, controls and exposed mice were killed to evaluate the changes. Histological analysis and LFT were performed to detect the damage. TBARS detection was assessed for oxidative stress. Inflammatory infiltration, binucleation, and meganucleus were detected in the liver of V₂O₅-exposed mice ($p < 0.05$). Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were also significantly increased ($p < 0.05$). Lipid peroxidation was significantly higher in V₂O₅-exposed animals compared to controls ($p < 0.05$). V₂O₅ exposure induced inflammation and cell damage detected by the increase in ALT and AST levels, as well as histological changes that suggest regenerative changes, such as binucleation and meganucleus.

Keywords

binucleation, free radicals, lipid peroxidation, test of liver function, meganucleus, vanadium

Introduction

The liver as the major site for metabolism, biotransformation and detoxification of drugs and foreign compounds is constantly exposed to reactive oxygen species (ROS) resulting in oxidative stress and frequently, permanent and irreversible tissue damage (Bataller and Brenner, 2005). In normal conditions, the basal production of ROS is inactivated by effective endogenous antioxidant systems; when an imbalance between both occurs, noxious conditions are established. During oxidative stress, ROS can activate Kupffer cells and redox-sensitive transcription factors, such as the nuclear factor κ B (NF- κ B) and activator protein 1 (AP-1), which in turn initiate the synthesis of proinflammatory cytokines and fibrogenic mediators (Bataller and Brenner, 2005). ROS can also covalently modify proteins, lipids and DNA with the consequent loss of biological functions, cell viability and ultimately degenerative events in the liver (McCord, 2000; Valko et al.,

2005). In the liver, lipid peroxidation is responsible for necrosis and death of hepatocytes (Webb and Twedt, 2008), through elevated reactive lipid aldehyde production.

¹ Depto. Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México

² Laboratorio de Aminoácidos Excitadores/Depto. de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A., México City, México

³ Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México

⁴ Depto. de Cirugía, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubiran" (INCMNSZ), México City, México

Corresponding author:

Teresa I Fortoul, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CP 04510, Mexico city, Mexico
Email: fortoul@servidor.unam.mx

Environmental pollution caused by heavy metals is more often not the result of combustion of oil derivatives (Figueroa et al., 2006; Huang and Ghio, 2006). Vanadium is a major pollutant found in the air of highly contaminated urban localities. Its increased concentration in autopsies of Mexico city residents, especially in the lung tissues, has been well documented (Fortoul et al., 1996). Vanadium accumulates in the lungs, bone tissue and liver (Roschin et al., 1980). Vanadium inhibits several key enzymes of cell metabolism, including adenylyclases, kinases, ribonucleases, phosphatases and ATPases (Mujherje et al., 2004), in so doing it is logical to assume that the damage it causes at the cellular level is partially attributable to metabolic disruption and oxidative stress (Dafnis and Sabatini, 1994); oxidative stress could also act as a cofactor in pro-oxidant reactions by replacing the iron ions in Fenton's reaction (Fickl et al., 2006; Galaris et al., 2008).

The aim of our work was to determine, in a more integrative manner, histological, biochemical and ROS-mediated protein modifications in the liver of mice exposed to vanadium pentoxide (V_2O_5) via inhalation, in conditions that mimic those faced by human beings living in highly polluted environments.

Methods

Animals

Eight-week-old healthy male CD-1 mice (bred in the vivarium of our medical school) weighing 35 ± 2 g were housed in hanging plastic cages in an animal facility (at an average temperature of 21°C , 57% humidity, controlled lighting [12:12 h light/dark regime]) and fed Purina rat chow and water ad libitum. The experimental protocol was in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the local guidelines on the ethical use of animals from Mexico's Health Ministry (NOM-062-Z00-1999). For all experimental groups and procedures, animals were randomly selected.

Reagents

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, USA) or Merck (Mexico). Deionized water (Milli R/Q System, Millipore) was used for the preparation of all solutions.

Exposure regimen

Inhalation exposures were performed as described by Piñon-Zarate et al. (2008). Briefly, 0.02 M V_2O_5 (99.99% purity, Sigma-Aldrich) was added to deionized water containing 100 μl Tween-20/100 ml suspension. The aerosol inhalation chamber was an acrylic box measuring 45 cm \times 21 cm \times 35 cm that could house 25 mice per session and had a total volume of 3.3 L. The ultra-nebulation to generate the atmosphere was carried out using a DeVilbiss Ultra Neb 99 (Somerset, PA, USA) system that maintained a constant flow of 10 L/min. According to the manufacturer, about 80% of the aerosolized particles inhaled by the mice would be expected to have a mass median aerodynamic diameter of 0.5–5.0 μm .

The concentration of V_2O_5 in the inhalation chamber was quantified as previously described by Fortoul et al. (2002). A 0.22- μm filter was positioned at the external outlet of the ultra-nebulizer during each exposure period. At the end of each exposure the filter was removed and weighed. Vanadium concentration in each filter was analysed using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer Mod. 2380, Shelton, CT, USA), at a wavelength of 318.4 nm and a slit of 0.7 nm.

In these studies, a set of 10 mice were placed in the acrylic box to inhale V_2O_5 for 1 h/d, twice a week, for 12 weeks. Control mice (10) inhaled only the vehicle deionized water/Tween during each exposure.

Evaluation of serum liver function tests (LFTs)

Blood samples were obtained by intracardiac puncture prior to dissection. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 8 min at room temperature. Serum was separated and analysed in the automated system LX20 Mark (Automate Sample processing Systems, Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA), by following the manufacturer's instructions. Concentrations of albumin (g/dl), alkaline phosphatase (IU/L), alanine aminotransferase (ALT; IU/L), aspartate aminotransferase (AST; IU/L), direct bilirubin (DB; IU/L), and total bilirubin (TB; IU/L) were determined.

Tissue sampling and preparation

At the end of the inhalation protocol, mice from each group ($n = 10$ /cohort) or vehicle exposure were killed. The animals were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused, via the aorta, with saline solution containing 10% formaldehyde in phosphate

buffer. The liver was then removed and placed on ice. One fraction was processed for histological examinations (i.e. paraffin embedding and staining with haematoxylin-eosin for subsequent light microscopy evaluation). Sections were evaluated by two independent observers unaware of the tissue experimental procedure. The other fraction was homogenized within 10 min in 10 volume of ice-cold saline using a Dupont's Sorvall RC-5B centrifuge; the homogenates were then centrifuged at 4000g for 10 min at 4°C to yield a low-speed supernatant fraction that was used immediately for thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay.

Assay of lipid peroxidation

An accurate technique to evaluate lipid peroxidation is by estimating malondialdehyde (MDA) a by-product of peroxidated lipids using TBARS assay (Santamaria and Rios, 1993). In brief, for TBARS assay, the liver tissue was homogenized in 1 ml of saline solution (0.9% sodium chloride [NaCl]). An aliquot of 0.25 ml of this homogenate was added to 0.5 ml of the thiobarbituric acid ([TBA] 0.5% weight/volume [w/v] of TBA + 16% w/v of trichloroacetic acid + 2.5% volume/volume [v/v] of hydrochloric acid). To this mixture, 10/11 of aqueous desferrioxamine (1.5 mM) and 10 μ l of butylated hydroxytoluene (3.75% w/v) in methanol-water (50% v/v) were added in order to prevent artifactual increase in lipid peroxidation due to the presence of ferrous ions and the *in situ* overproduction of TBARS as a result of the boiling process in the technique, respectively. The mixture was submerged in a boiling water bath for 20 min and centrifuged (3000g for 15 min). The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm in a Beckman DU-6 UV visible spectrophotometer. A standard curve for TBARS formation was constructed using a periodic acid oxidation rate of 2-deoxy-D-ribose. Results were expressed as nmol of TBARS formed per mg of protein.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD. Comparisons among the groups were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post test. Differences are considered to be statistically significant at $p < 0.05$. The complete analysis was processed with SPSS 11.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA).

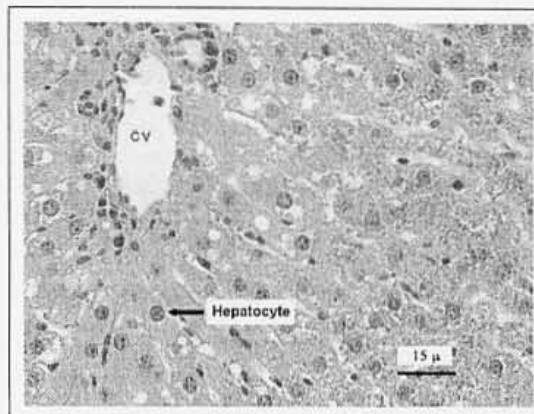


Figure 1. Photomicrograph of the liver of control mouse. A normal distribution of parenchymal tissue can be observed. Hepatocytes present a normal appearance. The central vein (CV) is shown, and the arrow indicates a hepatocyte nucleus. Haematoxylin and eosin staining ($\times 40$).

Results

Histological alterations

Mice liver tissue was evaluated for the presence of histological alterations, such as steatosis, swelling, necrosis, degeneration and fibrosis. Control group (Figure 1) presented a normal morphology; with hepatocytes measuring between 20 and 30 μ m in diameter and nuclei between 7 and 10 μ m in diameter. No signs of inflammatory response, degeneration, necrosis or liver fibrosis were found. Figure 2 depicts the appearance of liver tissue from the V_2O_5 -exposed group. Aberrant foci inflammatory were evident (eosinophils, neutrophils and mononuclear cells). Additional changes in this group comprised the presence of meganucleus. The number of the meganucleus in this group was significantly higher ($p < 0.05$) than that of the controls (Figures 3 and 4). With regard to the number of binucleated hepatocytes (another marker of morphologic hepatic alteration), these were significantly increased in the V_2O_5 -exposed group when compared to the controls ($p < 0.05$; Figures 4 and 5).

Oxidative damage to membranes

The levels of LP in the liver tissues of V_2O_5 -exposed mice and controls are shown in Figure 6. TBARS formation was significantly increased in the V_2O_5 -exposed group when compared with the control group ($p < 0.05$).

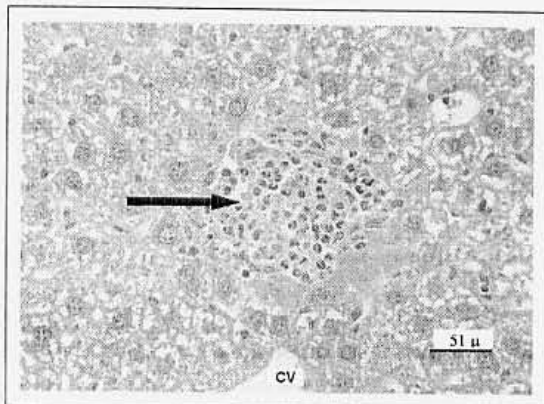


Figure 2. Photomicrograph of an infiltrated inflammatory periportal area with eosinophils, neutrophils and mononuclear cells from the liver of vanadium pentoxide-exposed mice. Black arrow indicates the inflammatory focus. Haematoxylin and eosin staining ($\times 40$).

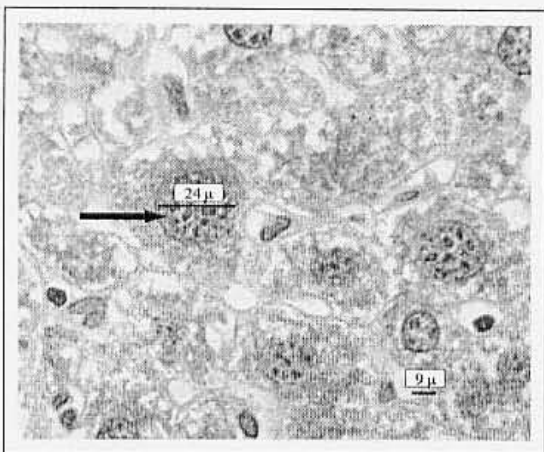


Figure 3. Photomicrograph of a hepatocyte with a meganucleus (indicated by the black arrow) of vanadium pentoxide-exposed group. Haematoxylin and eosin staining ($\times 40$).

Liver function

In regard to the results of those markers of liver function, there were no significant changes between the control and the V_2O_5 -exposed groups in DB, indirect bilirubin (IB) or albumin. In contrast, ALT and AST increased twofold with respect to the control group ($p < 0.05$; Figure 7).

Discussion

Regardless of the primary cause of degeneration, liver damage can be associated with specific patterns of

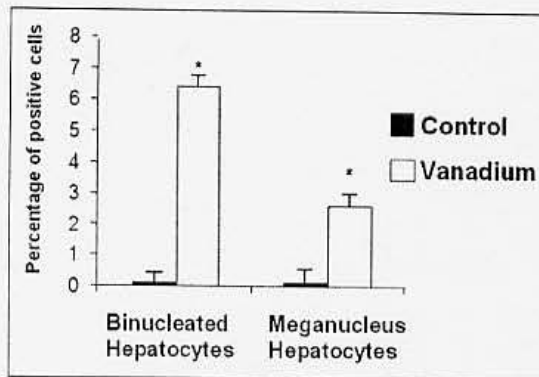


Figure 4. Percentage of binucleated hepatocytes and hepatocytes with meganucleus in the liver tissue from the control and vanadium pentoxide-exposed mice. Data from $n = 10$ mice per group. * $p < 0.05$ denotes differences when compared with the control group. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post test.

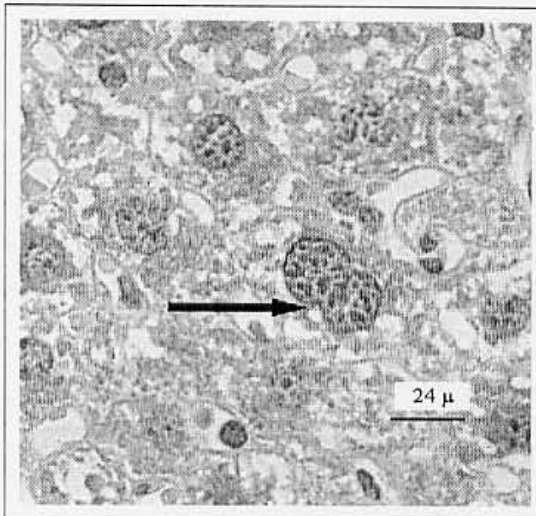


Figure 5. Photomicrograph of binucleated hepatocytes (pointed by black arrows) from vanadium pentoxide-exposed mice. Haematoxylin and eosin staining ($\times 40$).

biochemical abnormalities detectable in blood, and these alterations are grouped as general markers of LFT, commonly used in clinical trials for the estimation of the extent of liver damage (Chopra and Griffin, 1985; Reichling and Kaplan, 1988) and also useful in assessing pharmacological hepatotoxicity (Sheig, 1996). Furthermore, hepatocellular necrosis in blood is confirmed by means of aminotransferases, including AST and ALT. These enzymes catalyse the transfer of aspartate or alanine groups to ketoglutaric acid

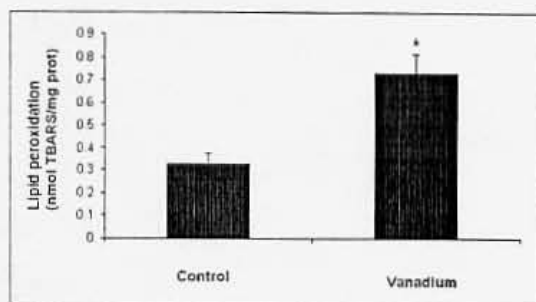


Figure 6. Quantification of lipid peroxidation in liver tissue from the control and vanadium pentoxide-exposed mice. Data from $n = 10$ mice per group. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post test * $p < 0.05$ denotes differences when compared with the control group.

to produce oxaloacetate and pyruvate, respectively (Giannini et al., 2005). ALT is a cytoplasmic enzyme, while AST is present in cytoplasmic and mitochondrial domains. It is assumed that the increase in the activity of these enzymes in serum is the result of their leakage from injured cells, thereby reflecting the extent of injury to hepatocytes. Therefore, high levels of these enzymes are seen in several liver diseases, especially in those associated with a significant degree of hepatocyte necrosis, such as acute viral hepatitis and ischemia. It is also important to mention that ALT is relatively specific to liver, whereas AST is located in heart muscle, kidney, brain, pancreas and blood cells, in addition to hepatocytes (Sheig, 1996). In general terms, liver damage can be identified by TB, DB) and IB, as well as alkaline phosphatase (FA), ALT, AST and albumin (Giannini et al., 2005). Its toxicity depends on its valence and its dual property to behave as cation and anion (Barceloux, 1999; Chakraborty et al., 2005).

Our results clearly show general alterations produced in the liver from mice exposed to inhaled vanadium, although in contrast to previous reports, there was no evidence of necrosis or degeneration (Roschin et al., 1980). Nonetheless, our results support the hypothesis that inhalation is an important route for liver poisoning caused by vanadium, and thus, this toxicant might considerably contribute to liver damage by altering its structure and function (Barceloux, 1999). As judged by our findings, vanadium is able to create pro-oxidant conditions directly in hepatocytes, and this has been supported by previously reported evidence (Dafnis and Sabatini, 1994).

Although our model explored only acute and subacute in a high-dose exposure to V_2O_5 , as a preliminary

approach this was sufficient to evoke hepatic alterations mediated by this metal in the liver, in our model the vanadium concentration in the inhalation chamber, the average concentration in the 18 filters was $1436 \pm 225 \mu\text{g}/\text{m}^3$ during the whole experiment. This simple condition has not been reported not far from cases of human exposure, because to our knowledge it is simulating situations such as exposures during intense fires, burning oil wells, during burner cleaning or other working exposures scenarios. In this regard, 'burner' syndrome, in which one of the symptoms is greenish tongue, has been characterized as typical of vanadium poisoning (Dafnis and Sabatini, 1994; Roschin et al., 1980; Woodin et al., 2000).

Going through the assessment of liver function, we were able to collect only limited evidence of alterations induced by the toxicant. Therefore, various conditions of vanadium exposure should be explored in further studies in order to clarify any possible alteration induced by this metal, simulating the human exposure condition. In the meantime, in order to validate our model, any inference in relation to vanadium exposure in humans should be made on the basis of all those factors accounting for liver damage (Giannini et al., 2005). Despite the limitations in our model, the extent of damage found in liver correlated with the markers of OS explored as well as with the degree of morphologic alterations in hepatocytes.

The changes found in the liver from vanadium-exposed mice also mimicked those alterations described for poisoning with alkaloid pyrrolizidine (Jago, 1969), in which a pathognomonic finding includes increase in the size of the nuclei of hepatocytes. The size of the nuclei of hepatocytes increased to about $30 \mu\text{m}$ which is a criteria currently employed to define meganucleus (normal sizes range from 7 to $10 \mu\text{m}$); in our model, this is suggestive of hypertrophy and liver regeneration due to liver damage (Jago, 1969; Svoboda et al., 1971).

The increase in the number of binucleated hepatocytes might be related to the extent of damage produced by vanadium to the cytoskeleton at the nuclear level, a condition that may be involved in pausing mitosis (Domingo, 1996). The polyploidy of the liver is also generally considered to show terminal differentiation and senescence (Toyoda et al., 2005). It was revealed that the increase in the oxidative stress can result in significant oxidative DNA damages in the liver of mouse. It was also reported that hepatic polyploidy is induced by oxidative injury and attenuates the proliferative potential of cells (Gorla et al.,

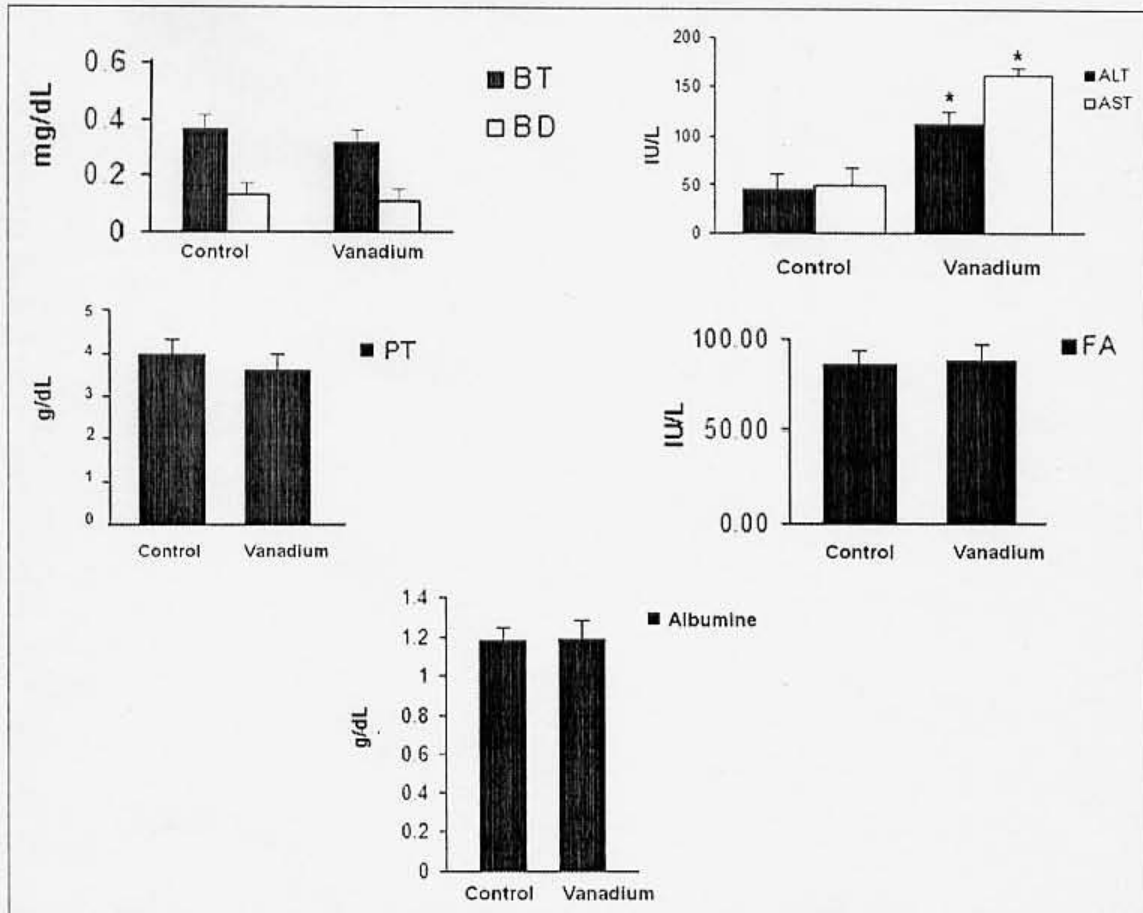


Figure 7. Liver function tests (LFTs) of the serum from the control and vanadium pentoxide-exposed mice. Data from $n = 10$ mice per group. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post test. * $p < 0.05$ denotes differences when compared with the control group. Total protein (TP; g/dl), albumin (g/dl), direct bilirubin and total bilirubin (IU/L), alkaline phosphatase (IU/L), were not statistically significant, when compared to alanine aminotransferase (ALT; IU/L) and aspartate aminotransferase (AST; IU/L). There was a statistically significant difference between the vanadium-exposed group and the control group.

2001). Our findings regarding a stimulated LP in liver caused by vanadium exposure could be the result of major alteration in the antioxidant defense systems (Halliwell and Chirico, 1993). This may be suggested on the basis of previous reports showing lower activity of superoxide dismutase (SOD), decreased levels of the endogenous antioxidant, and reduced glutathione (GSH), in other toxic models with oxidative alterations such as LP (Webb and Twedt, 2008). Increased LP in liver is the unequivocal result of the deleterious actions of ROS and shows decline in hepatocyte membrane functions, further leading to altered fluidity, reduction in the electrochemical cell potential, and increased permeability across the membrane and cell damage (Webb and Twedt, 2008).

In regard to the alterations in ALT and AST levels found in our study, it is known that the increase in these enzymes in serum is the result of their leakage from injured cells, and therefore, it reflects a certain degree of injury to hepatocytes, especially to their membranes (Reichling and Kaplan, 1988). These enzymes are high in many forms of liver disease, but particularly in those hepatocytes resulting in necrosis, as it has been observed in acute viral hepatitis and ischemia (Chopra and Griffin, 1985; Giannini et al., 2005). Taking into consideration that ALT is specifically located only in the liver, while AST is widely located, besides hepatocytes (Giannini et al., 2005), it can be inferred that vanadium is capable of causing damage in central nervous system and lung (Fortoul

et al., 1996; Valko et al., 2005), as judged by the elevated levels of AST. Concerning to the raised levels of ALT, we could suggest a smolder inflammatory process as a consequence of the exposure, since the half-life of vanadium is about 50 days, and its presence could maintain the oxidative stress in the liver (Ramaiah, 2007).

In summary, these events may be playing a role in the further development of liver pathology, and more research should lead us to consider the possible damage of the liver in areas with high atmospheric pollution.

Acknowledgements

The authors thank the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. G Cano-Gutiérrez received a scholarship from CONACyT, México. The authors thank Veronica Rodríguez-Mata for her technical assistance.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, and Parson PJ (2005) A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environmental Health Perspectives* 113(12): 1669–1674.
- Barceloux DG (1999) Vanadium. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* 37(2): 265–278.
- Battaller R and Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 115: 209–212.
- Chakraborty T, Samanta S, Ghosh B, Thirumoorthy N, and Chatterjee M (2005) Vanadium induces apoptosis and modulates the expressions of metallothionein, Ki-67 nuclear antigen, and p53 during 2-acetylaminofluorene-induced rat liver preneoplasia. *Journal of Cellular Biochemistry* 94(4): 744–762.
- Chopra S and Griffin PH (1985) Laboratory tests and diagnostic procedures in evaluation of liver disease. *American Journal of Medicine* 79(2): 221–230.
- Dafnis E and Sabatini S (1994) Biochemistry and pathophysiology of vanadium. *Nephron* 67(2): 133–143.
- Domingo JL (1996) Vanadium: a review of the reproductive and development toxicity. *Reproductive Toxicology* 10(3): 175–182.
- Fickl H, Theron AJ, Grimmer H, Oommen J, Ramafi GJ, Steel HC, et al. (2006) Vanadium promotes hydroxyl radical formation by activated human neutrophils. *Free Radical Biology & Medicine* 40(1): 146–155.
- Figueroa DA, Rodríguez-Sierra CJ, and Jimenez-Velez BD (2006) Concentrations of Ni and V, other heavy metals, arsenic, elemental and organic carbon in atmospheric fine particles (PM 2.5) from Puerto Rico. *Toxicology and Industrial Health* 22(2): 87–99.
- Fortoul TI, Osorio LS, Tovar AT, Salazar D, Castilla ME, and Olaiz-Fernandez G (1996) Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico City residents: comparison of cases from the 1950s and the 1980s. *Environmental Health Perspectives* 104(6): 630–632.
- Galaris D, Mantzaris M, and Amorgianiotis C (2008) Oxidative stress and aging: the potential role of iron. *Hormones* 7(2): 114–122.
- Giannini EG, Testa R, and Savarino V (2005) Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal* 172(3): 367–379.
- Gorla GR, Malhi H, and Gupta S (2001) Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *Journal of Cell Science* 114(Pt 16): 2943–2951.
- Halliwell B and Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *American Journal of Clinical Nutrition* 57(5 suppl): 715–725.
- Huang YC and Ghio AJ (2006) Vascular effects of ambient pollutant particles and metals. *Current Vascular Pharmacology* 4(3): 199–203.
- Jago MV (1969) The development of the hepatic megalocytosis of chronic pyrrolizidine alkaloid poisoning. *American Journal of Pathology* 56: 405–421.
- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine* 108(8): 652–659.
- Mujherje B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, and Chatterjee M (2004) Vanadium an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters* 150(2): 135–143.
- Ramaiah SK (2007) A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology* 45(9): 1551–1557.
- Reichling JJ and Kaplan MM (1988) Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Digestive Disease Science* 33(12): 1601–1614.
- Rios C and Santamaria A (1991) Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochemical Research* 16(10): 1139–1141.
- Roschin AV, Ordzhonikidze EK, and Shalganova IV (1980) Vanadium-toxicity, metabolism, carrier state. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 24(4): 377–383.
- Santamaria A and Rios C (1993) MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neuroscience Letters* 159(1-2): 51–54.