



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

INHALACIÓN DE ACETATO DE PLOMO Y DAÑO HEPÁTICO.
ESTUDIO MORFOFUNCIONAL EN UN MODELO MURINO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOL. GONZALEZ RENDON ELENA SHEREZADA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. ABEL SANTAMARIA DEL ÁNGEL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., DICIEMBRE, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

OFICIO CPCB/1012/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de marzo de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **GONZALEZ RENDÓN ELENA SHEREZADA** con número de cuenta **97216278**, con la tesis titulada **"INHALACIÓN DE ACETATO DE PLOMO Y DAÑO HEPÁTICO. ESTUDIO MORFOFUNCIONAL EN UN MODELO MURINO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**:

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Secretario: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
Suplente: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de octubre de 2018

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número (CVU/Becario) 225692/211000.
- Al Tutor Principal

Dra. Teresa Imelda Fortoul van de Goes.

- A los miembros del Comité Tutor.

Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte, su exigencia me alentó en cada tutorial a esforzarme, hasta el final me recordó la importancia de lo que estaba haciendo y el empeño que debía de poner en hacer las cosas dignas de una alumna de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Abel Santamaría por sus comentarios siempre me orientaron para mejorar este proyecto.

Agradecimientos

A mi tutora la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes, le agradezco el arrastrarme a terminar este proceso. Usted fue mi apoyo no solo en concluir esta tesis, me jalo a retomar la confianza, recordar quien soy y de lo que soy capaz.

Al Dr. José Pedraza Chaverri, por su revisión y por estar pendiente hasta la defensa oral de mi tesis doctoral.

A la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta, por su revisión y sus comentarios.

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, por su revisión y comentarios.

Al Biól. Armando Zepeda Rodríguez y al Biol. Francisco Pasos Nájera, del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por su ayuda en las fotografías tomadas para este trabajo.

Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y al Dr. Ismael Torres Salgado personal del bioterio de la Facultad de Medicina por su apoyo en la obtención, cuidado y manejo de los animales experimentales.

A la Dra. Mireya Alcaraz Zubeldía por abrirme su laboratorio y apoyarme en la cuantificación del plomo en hígado y sangre.

Al Dr. Omar Noel Medina Campos por su apoyo en la evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

A Alejandra Nuñez Fortoul por la revisión del idioma del artículo, requisito para la obtención del grado.

A el Dr. Gumaro Cano, gracias doctor por su apoyo en las pruebas de función hepática.

A la Dra. Marcela Rojas Lemus, gracias mi querida Marce por toda tu ayuda, por tus comentarios, sugerencias, gracias por ser más que una compañera de laboratorio una amiga.

A la Dra. Adriana González Villalba, la M. en C. Patricia Bizarro Nevares, la Dra. Martha Ustarroz, compañeras de laboratorio por sus consejos y apoyo.

A todos los que vi pasar por el laboratorio durante 8 años, fueron muchos.

A mis amigas la Dra. Gabriela Martínez Lemus y la Dra. Adriana Minor García, por siempre estar a pesar de estar tan lejos.

Dedico esta tesis a:

Dios, por siempre tenerme bajo su cuidado, ir a buscarme cada vez que me había perdido, por darme fuerza, valor y coraje para continuar. Su infinita gracia, su amor y misericordia me permiten concluir este proceso y no es por mi asombrosa tenacidad, es por El. El me mando personas tan maravillosas como:

- Mi madre, que nunca deja de apoyarme y creer en mí, por cuidar de mis hijas con tanto cariño y amor.
- Mi padre, gracias a su apoyo no nos falta alimento, vestido y techo a mis hijas y a mí. Y he podido concluir este proceso aún con dos pequeñas.
- Mis hijas, mis preciados ángeles mandados por Dios para alentarme cada día a esforzarme y ser mejor persona. Las amo mis pequeñas, la obtención de esté grado es para ustedes, para enseñarles que por difícil que parezca debemos cumplir con quienes nos comprometemos.
- Mi hermano, parece que estas ajeno a muchas cosas y no les das importancia, pero tú también me apoyaste Charly, gracias.
- A mi tío Abel, mi tía Lupita, Abel, Guillermo, Alfredo por que hasta hace poco que lo tengo, pero su cariño y aprecio con sus palabras de aliento y cariño me dan fuerza.
- A mis amigos y hermanos en Cristo por sus oraciones Pr. Daniel Benson, Pr Gilberto Sagarci, Gaby, Boy, Erika y Ale.

ÍNDICE

	página
A. Lista de figuras	
B. Lista de tablas	
C. Abreviaturas	
1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
3.1 Toxicidad del plomo	7
3.2 La estructura del hígado	10
3.3 Toxicidad del plomo en el hígado	14
3.4 Pruebas de funcionamiento hepático	16
3.5 Estrés oxidante y producción de radicales libres	18
3.6 Estrés oxidante y plomo	25
3.7 Los antioxidantes	29
3.8 Terapia en la intoxicación por plomo	35
3.9 S-Alilcisteína	36
4. Planteamiento del problema	37
5. Objetivos	38
5.1 Objetivo general	38
5.2 Objetivos particulares	38
6. Hipótesis	39
7. Metodología	40

7.1 Lista de reactivos	40
7.2 Diseño experimental.	40
7.3 Determinación de las concentraciones de plomo en hígado y sangre	41
7.4 Análisis histológico.	42
7.5 Evaluación de la función hepática (PF).	43
7.6 Determinación de 4-Hidroxinonenal y nitrotirosina por inmunohistoquímica.	43
7.7 Determinación de las enzimas antioxidantes endógenas	45
7.8 Análisis estadístico	46
8. Resultados	47
8.1 Concentración de plomo	47
8.2 Cambios histológicos	48
8.3 Pruebas de funcionamiento hepático	51
8.4 Determinación de 4-Hidroxinonenal y nitrotirosina por inmunohistoquímica.	53
8.5 Enzimas Antioxidantes endógenas	60
9. Discusión	62
10. Conclusión	70
11. Literatura citada	72
12. Apéndice	85
12.1 Artículo requisito	85

Lista de figuras

Figura	página
1. Células que constituyen el parénquima hepático	12
2. Estructura morfofuncional del parénquima hepático	14
3. Formación de especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación	23
4. Mecanismos involucrados en el daño oxidante celular inducido por el plomo.	27
5. Cambios histológicos en el hígado de ratón	49
6. Diferencias en el tamaño de los núcleos	50
7. Porcentaje de meganúcleos.	51
8. Inmunohistoquímica para 4-HNE y nitrotirosina.	55
9. Valores de densidad media para el 4-HNE y la nitrotirosina	56
10. Inmunohistoquímica para 4-HNE	58
11. Densidad media para 4-HNE	59
12. Actividad total de las enzimas antioxidantes (A)	61
13. Actividad total de las enzimas antioxidantes (B)	62

Lista de tablas

Tabla	página
1. Antecedentes de los efectos de plomo	16
2. Lista de reactivos	39
3. Concentración de Plomo en sangre y tejido hepático	47
4. Pruebas de Función hepática	53

Abreviaturas

ALAD	δ – aminolevulinico dehidratasa
ALT	Alanina amino transferasa
AST	Aspartato amino transferasa
ATP	Adenosín trifosfato
DCT1	Transportador de cationes divalentes 1
DMT1	Transportador de metales divalentes 1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Cinasas activadas por señales extracelulares
GABA	Ácido gamma – aminobutírico
GPx	Glutación Peroxidasa
Gr	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GST	Glutación – S – transferasa
H ₂ O ₂	Peróxido de oxígeno
IREGI	Proteína regulatoria de hierro
JNK	Quinasas N – terminal
MAD	Metilendioxianfetamina
MAP cinasas	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MTP	Proteína transportadora de metales
NADH	Dinucleótido de nicotinamida
NADP	Dinucleótido de nicotinamida fosfato
NBT	Nitro blue tetrazolium
NCTP	Polipéptido co-transportador de Sodio
NO	Monóxido de nitrógeno o óxido nítrico
NO ⁻	Anión nitroxilo
NO ⁺	Catión nitrosonio
NOS	Óxido nítrico sintasa
NRAMP	Proteína de resistencia natural asociada a macrófagos
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OAT	Transportador de aniones orgánicos
OCT	Transportador de cationes orgánicos
OH ⁻	Radical hidroxilo
Pb	Plomo
PM	Partículas por millón
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Supero óxido dismutasa
UCMSC's	Células madre mesenquimatosas de cordón umbilical
δ – ALA	δ – aminolevulínico

1. Resumen.

El plomo (Pb) es un metal pesado que juega un papel biológico desconocido y es muy tóxico incluso en bajas concentraciones. Las principales fuentes del Pb son las zonas contaminadas por plomo en zonas industriales o tiraderos. A la fecha, no existe información del efecto del Pb por vía inhalada y su impacto en el hígado, tomando en cuenta que la vía inhalada es una de las rutas más comunes de exposición a este metal.

Material y Métodos: Treinta ratones macho fueron expuestos a [0,1 M] de acetato de plomo por vía inhalada, durante un periodo de 8 semanas, dos veces por semana por una hora y un grupo de recuperación, post-exposición libre de Pb por 4 semanas. Se utilizó a la S – alilcisteína (SAC) para evaluar la capacidad preventiva de la SAC ante los efectos del plomo, por lo que se añadieron dos grupo SAC y SAC + Pb, evaluándose durante 4 y 8 semanas.

Resultados: La evaluación histológica reveló un aumento del infiltrado inflamatorio en el hígado de los ratones expuestos a Pb, desde las primeras semanas de exposición. La administración de la SAC previno el daño histológico en el hígado. En las pruebas de función hepática se observó un aumento significativo de la concentración de aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT) y deshidrogenasa láctica (LD) El tiempo de 4 semanas sin exposición, permitió la disminución en la concentración de ALT y AST. La SAC previno el aumento de la ALT.

Los resultados obtenidos de la evaluación por inmunohistoquímica para la marca de 4- hidroxinonal (4-HNE) y nitrotirosina revelaron que los ratones expuestos a Pb presentaron un incremento significativo en la generación de estrés oxidante. Este efecto se observó también a las 8 semanas de exposición. El periodo de 4 semanas sin exposición fue suficiente para que la generación de estrés oxidante generado por la exposición con Pb disminuyera. La administración de SAC previno la generación de especies reactivas.

El plomo indujo un aumento en la concentración de catalasa y glutatión –S-transferasa (GST) y disminuyó significativamente la concentración de glutatión reductasa (Gr). La SAC previno el aumento de catalasas y GST, así como la disminución de la Gr.

Conclusión: Nuestros resultados demuestran que a pesar de que los pulmones son el primero contacto y filtro en la exposición de Pb por vía inhalada, el Pb es capaz de llegar al hígado, provocar daño y estrés oxidante, el cual es revertido por la SAC.

2. Abstract

Lead (Pb) is a heavy metal that plays an unknown biological role and is very toxic even at low concentrations. The main sources of Pb are areas contaminated by lead in industrial areas or landfills. There is little information about Pb by inhalation and its effect on the liver, based on the fact that the inhaled route is one of the most common routes of exposure to this metal.

Material and Methods: Thirty male mice were exposed to [0.1 M] of lead acetate by inhalation, during a period of 8 weeks, twice a week for one hour, following the protocol proposed by Fortoul et al. (2005) and a recovery group, post-exposure free of Pb for 4 weeks. The SAC was used to evaluate the antioxidant capacity of the SAC before the effects of the lead, for which two SAC and SAC + Pb groups were added, being evaluated during 4 and 8 weeks.

Results: The histological evaluation showed an increase of the inflammatory infiltrate in the liver from the first weeks of exposure. In the liver function tests a significant increase in the concentration of AST was observed. However, no significant increase in serum ALT concentrations was found.

No significant differences were observed in histological evaluation and liver function tests between the control group, the antioxidant group, and antioxidant plus lead.

Evaluation by immunohistochemistry showed that mice exposed to Pb had a significant increase in the label for 4-hydroxynonenal and nitrotyrosine compared to control groups. This effect was observed throughout the time of exposure to Pb for 8 weeks. After exposure and during recovery, the label for 4-hydroxynonenal and nitrotyrosine decreased to concentrations similar to those of the control group, indicating a decrease in the generation of oxidative stress generated by exposure to Pb. There were no significant differences in the 4 HNE brand between the control group, the antioxidant group, and antioxidant plus lead.

Groups I, V and VI (Control, SAC and SAC + Pb) during the 4 and 8 weeks of exposure did not show significant differences in the activity (IU / mg protein) of antioxidant enzymes evaluated (catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, superoxide dismutase).

In the group exposed to Pb [0.1M] and the rest of the groups (Control, SAC and SAC + Pb) significant differences were observed in the activity of catalase enzymes, glutathione-S-transferase and glutathione reductase.

Conclusion: Our results show that although the lungs are the first contact and filter in the exposure of inhaled-Pb, the Pb is able to reach the liver and to cause damage by oxidative stress, which was reversed by S-allylcysteine.

3. Introducción

El plomo (Pb) es un elemento que no desempeña una función biológica conocida, y es altamente tóxico aún en bajas concentraciones, 1985). Es considerado un contaminante, tanto ocupacional como ambiental, y continúa representando un importante problema de salud en algunos sectores de la población (Garg *et al.*, 2007).

En las décadas de los 70's y 80's la presencia de gasolinas con un alto contenido de Pb (0.5 – 1 mL como tetraetilo de plomo/gal) incrementó las concentraciones de este elemento en el ambiente, por lo que para mitigar las emisiones del mismo a la atmósfera fue necesario generar gasolinas con bajos contenidos de Pb (con un valor máximo de 0.13 mL de tetraetilo de plomo/gal). Sin embargo, a pesar de la introducción de gasolinas con bajos niveles de Pb en 1994, los niveles de plomo en aire, agua y suelo se mantienen en las ciudades de los países en desarrollo (Meneses-González *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2010). En la actualidad, las principales emisiones de Pb se presentan en el almacenamiento de baterías, los materiales para construcción, las aleaciones, el vidrio, la cerámica, los estabilizadores de plásticos y, aunque con menor aportación, como aditivo antidetonante en la gasolina. (Mudipalli, 2007). Otra fuente de emisión importante es el humo del tabaco, ya que un cigarrillo común contiene entre 0.92 – 5.79 ppm de plomo (Verma *et al.*, 2010).

Los estudios más recientes de la concentración de Pb en la atmósfera de la ciudad de México son de muestras tomadas en 2006, donde Adachi y Busek (2010)

encontraron una concentración de 62 ng Pb/m³ en partículas suspendidas (PM_{2.5}). En un estudio anterior, en muestras de lluvia tomadas de 2003 – 2004, se reportan concentraciones de 5.41 µg/L (García *et al.*, 2009). En la actualidad la norma mexicana **NOM-026-SSA1-1993**, establece 3.2 µg de Pb/m³ como valor máximo para la protección a la salud de la población. A la fecha la norma mexicana, no se ha revisado.

Las principales rutas de exposición al plomo ocurren a través del tracto respiratorio y gastrointestinal. La penetración, acumulación y retención de las partículas con Pb vía inhalación dependen de la tasa respiratoria, el volumen, el tamaño de la partícula y la depuración mucociliar y alveolar. La acumulación ocurre en las áreas nasofaríngea, traqueobronquial (partículas con diámetro > 1 µm) y alveolar (partículas entre 0.05 – 1 µm). Después del depósito en la zona alveolar la absorción depende del tamaño de la partícula, de la solubilidad del compuesto y de las variaciones fisiológicas y patológicas del individuo. La absorción más alta se presenta en el caso de la inhalación del humo proveniente de motores y sales de plomo altamente solubles; así como en personas fumadoras o que presenten una enfermedad crónica o aguda en el sistema respiratorio superior. Una vez en la sangre el Pb se distribuye al parénquima de los órganos, dependiendo del gradiente de concentración y de la afinidad específica del tejido (Tsalev and Zapriano, 1985).

El Pb se distribuye en tres compartimentos, el primer compartimiento la sangre; los tejidos blandos (hígado, riñón, medula ósea y sistema nervioso central) constituyen el segundo compartimento y representan los órganos blanco de daño y el último compartimento está dado por el hueso, en el cual el Pb es inerte. Sin embargo, el

Pb puede mobilizarse del hueso a la sangre durante el embarazo, en edad avanzada, por circunstancias que generaran inmovilidad y ante enfermedades como hiperparatiroidismo. En el hígado se presenta con un porcentaje de acumulación de 33% de Pb (Mudipalli, 2007).

El 99% del Pb presente en la sangre se encuentra unido a los eritrocitos, dentro de los eritrocitos el plomo se une al ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD), enzima que representa el principal sitio de unión del plomo en los eritrocitos, en particular ALAD 2 tiene mayor afinidad por el Pb que ALAD 1 (Poma, 2008). El plomo tiene un tiempo de vida media en sangre de 35 días (Rabinowitz *et al.*, 1976).

El ingreso del Pb al hígado, por la vía inhalada, se da a partir de la llegada de la sangre a las arterias hepáticas derecha e izquierda; ambas penetran en el hígado y originan numerosas ramas que se ramifican en todo el órgano. Posteriormente, la sangre es transportada por medio de las venas hepáticas, para vaciar su contenido en la vena cava inferior (Montalvo, 2008).

El Pb trasladado por la sangre, utiliza los mecanismos de transporte de los iones divalentes con función biológica conocida para atravesar la membrana de los eritrocitos. La liberación de metales desde las células sanguíneas es mediada por dos proteínas, IREG1 (proteína reguladora de fierro 1) y hefaestina, estas dos proteínas trabajan de manera acoplada para la exportación de los metales a través de la membrana basolateral de las células. La proteína IREG1 es también llamada

MTP1 (proteínas transportadora de metales) o ferroportina, es una proteína transmembranal y se expresa en tejidos envueltos en la homeostasis de Fe. En ratones la expresión de IREG1 está recíprocamente regulada por el hígado y el duodeno. La hephaestina es una proteína transmembranal homóloga a ceruloplasmina y es necesaria para la salida de hierro de los eritrocitos (Ballatori, 2002).

El transportador de cationes divalentes 1 (DCT1) es un transportador de metales multi-específico de la familia de NRAMP (proteína de resistencia natural asociada a macrófagos) también conocido como NRAMP1 (proteína de resistencia natural asociada a macrófagos 1) o DMT1 (transportador de metales divalentes 1) se expresa en diferentes tejidos, incluyendo el riñón y el hígado. DCT1 es capaz de transportar una variedad de cationes metálicos divalentes (Fe, Zn, Mn, Co, Cd, Ca, Cu, Ni y Pb) mediante un mecanismo dependiente de potencial de membrana y acoplado a protones. Este transportador media la incorporación de metales dentro del hígado desde la sangre sinusoidal (Ballatori, 2002).

Los metales se unen a complejos orgánicos como metalotioneinas, ferritina, transferrina, melanotransferrina, hemosiderina, ceruloplasmina, citrato, ascorbato, GSH, cisteína y otros aminoácidos. A través de la unión a estos complejos orgánicos la reactividad de metales esenciales puede ser regulada y también representa un mecanismo de protección para los metales no esenciales. Sin embargo, estos complejos también permiten el transporte de los metales por medio del

transportador de cationes orgánicos (OCT del inglés Organic Cation Transporters), el transportador de aniones orgánicos (OAT's del inglés Organic Anion Transporter) y el polipéptido co-transportador de Na^+ - taurocolato o transportador del ácido biliar hepático (NCTP del inglés Na^+ - taurochobile [bile acid]- cotransporting polypeptide) (Ballatori, 2002). El tiempo de vida media del Pb en hígado es de 40 días.

3.1 Toxicidad de plomo

Debido a su tamaño y carga, el Pb puede sustituir al calcio (Pb^{2+} : 0.84 Å; Ca^{2+} : 0.99 Å) acumulándose preferentemente en el tejido óseo (Merrill *et al.*, 2001). El Pb unido a hueso es biológicamente inerte, pero bajo ciertas condiciones (alteraciones en el balance ácido base, infecciones, intervenciones quirúrgicas, tratamientos con ciertos medicamentos, embarazo, etc.) puede ser movilizado y generar síntomas de intoxicación, a pesar de que la exposición haya cesado. El plomo absorbido se elimina principalmente a través de la orina (75 – 80%) y en menor porcentaje en la bilis, piel, cabello, uñas y sudor (Schutz *et al.*, 1987).

A la fecha, no se ha descrito un mecanismo único de toxicidad del plomo. Sin embargo, un desbalance en el estrés oxidante debido a la intoxicación por plomo se puede generar en diferentes niveles: en presencia de ion ferroso (Fe^{2+}) el plomo puede inducir per-oxidación lipídica, por la alteración de enzimas antioxidantes (catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) y de

sustratos de enzimas antioxidante como el glutatión (GSH). Finalmente el Pb incrementa la concentración de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA) (Martínez 2011).

Uno de los mecanismo de toxicidad del plomo está dado por la unión éste a proteínas que poseen grupos sulfhídricos, amina, fosfato y carboxilo lo que provoca su inhibición (Poma, 2008). La ALAD es una enzima relacionada con la biosíntesis del grupo hemo que se altera por la unión de Pb al sitio activo, lo que provoca cambios en su estructura y resultando en un bloqueo de la síntesis de hemoglobina y finalmente anemia (He *et al*, 2014).

La exposición aguda a Pb puede causar anemia hemolítica y la exposición crónica puede causar anemia hipo-crómica normocítica o microcítica asociada a reticulocitosis (Poma 2008). El Pb induce cambios en la membrana celular de eritrocitos, inhibiendo la síntesis de hemoglobina y disminuye la producción de eritrocitos o reducción de su sobrevivencia (Sun *et al*, 2012).

Sun y *cols.* (2012) informaron que la proliferación de las células madre mesenquimatosas de cordón umbilical (UCMSCs) se afectó al exponer a las células a concentraciones de plomo de 10 μ M. El plomo suprime la auto-renovación y el potencial de diferenciación de las UCMSCs e induce un efecto adverso sobre la expresión de citocinas de las UCMSCs.

En riñón, exposiciones agudas a plomo se asocian con alteraciones reversibles de la función tubular proximal como glicosuria, aminoaciduria y hiper-fosfaturia. Ante una exposición crónica a plomo puede causar nefritis intersticial, generalmente irreversible.

La exposición a Pb está asociada con daño neurológico o alteraciones en la conducta a largo plazo, daño cognitivo provocando disminución en la atención con hiperactividad, sordera, alteraciones del equilibrio y de los nervios periféricos. Así mismo, trabajadores expuestos a plomo presentaron parálisis del nervio radial, debido a una disminución en la conducción del nervio y debilidad muscular. En exposiciones agudas puede provocar encefalopatías con la presencia de ataxia, convulsiones, hiperirritabilidad, estupor, coma y muerte (Poma, 2008). El plomo atraviesa la barrera hematoencefálica por medio del mecanismo de transporte de Ca^{2+} y promueve la activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAP cinasas) en las células gliales, incrementando la apoptosis y las alteraciones morfológicas en astrocitos. El efecto apoptótico en los astrocitos se debe a la activación de cinasas activadas por señales extracelulares (ERK), que a su vez activan la vía de las quinasas N terminales c-Jun (JNK), seguido de un aumento de Ca^{2+} y la generación de especies reactivas de oxígeno. El daño en los astrocitos puede relacionarse con una hipofunción patológica del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Rai *et al*, 2010).

A nivel reproductivo la exposición aguda al Pb causa disminución de la cuenta total de espermatozoides y aumento en la proporción de espermatozoides anormales. La exposición crónica disminuye la concentración, cuenta total y motilidad de espermatozoides. Existe una relación proporcional entre el número de abortos, partos prematuros y recién nacidos con bajo peso, aún con bajos niveles sanguíneos de Pb.

El Pb se distribuye rápidamente entre todas las estructuras celulares, pero se une firmemente a la mitocondria, lo cual genera un alto grado de toxicidad (Tsalev and Zapriano, 1985).

3.2 La estructura del hígado

El hígado es el órgano interno más grande de los vertebrados se localiza en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal. En mamíferos se divide en lóbulo derecho, izquierdo, cuadrado y caudo. Está rodeado por tejido conjuntivo que forma la cápsula de Glisson. La cápsula de Glisson se adentra en el parénquima formando trabéculas conjuntivas (fibras de colágeno) que rodean los cordones hepáticos y se organizan en lobulillos (la unidad estructural hepática). Presenta un hilio por donde penetra la vena porta y las arterias hepáticas derecha e izquierda y emerge el conducto hepático biliar. En el hilio la cápsula de Glisson penetra

rodeando la vena porta, la arteria hepática y el conducto hepático biliar, en el interior del parénquima rodea una unidad tisular formada por ramas más delgadas de estos conductos y constituyen las triadas porta (Montalvo, 2008).

El parénquima del hígado está constituido por los hepatocitos, las células endoteliales, las células de Ito (células estelares) y las células de Kupffer (figura 1). Los hepatocitos son células poliédricas grandes, presentan varias superficies orientadas hacia dos dominios. El dominio basolateral, los hepatocitos presentan abundantes microvellosidades y se sitúa frente espacio perivascular, el espacio de Disse. El exceso de líquido en el espacio de Disse se recoge en el espacio de Mall, o Möll, localizado en la periferia de la triada portal. En el dominio apical limita el canalículo biliar, una depresión sellada por uniones oclusivas para evitar la fuga de la bilis (Kierszenbaum y Tres, 2012). Los lipocitos, también llamadas células de Ito, se localizan en el interior del espacio de Disse, tiene prolongaciones que rodean a los capilares sinusoidales y almacenan lípidos y vitaminas liposolubles. 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. Las células de Kupffer se localizan detrás del endotelio sinusoidal; poseen capacidad fagocítica, pertenecen al sistema monocito-macrófagos, pues derivan de estas células y además son células presentadoras de antígeno (Montalvo, 2008).

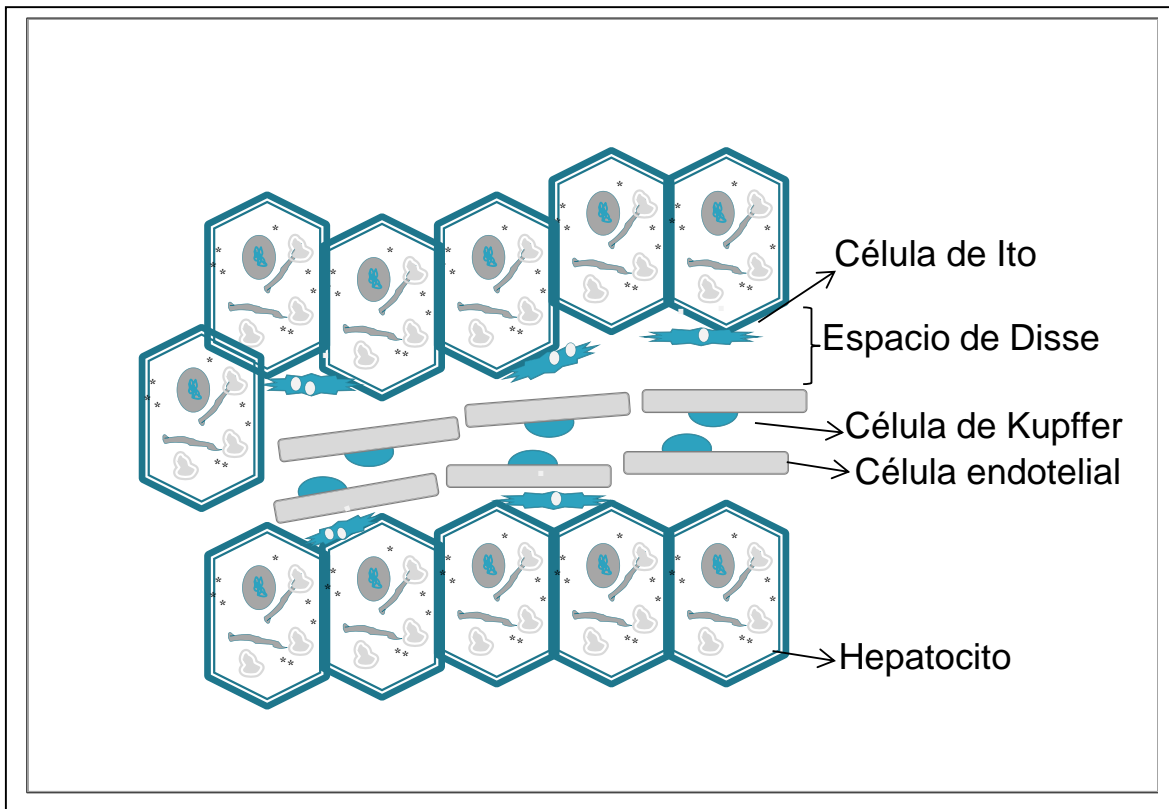


Figura 1. Células que constituyen el parénquima hepático. Las células que conforman al hígado son los hepatocitos, las células de Kupffer y las células de Ito (del autor).

Existen tres formas de interpretar la estructura morfofuncional (ver figura 2) del parénquima hepático (Geneser, 2000; Montalvo, 2008):

1. El lobulillo hepático, se considera no solo la unidad estructural anatómica, también es una unidad funcional, presenta una forma hexagonal y está limitado por tejido conectivo interlobulillar. Al corte transversal se observa que los lobulillos están compuestos por cordones de hepatocitos que irradian hacia la periferia desde un pequeño vaso central, la vena central y están separados por sinusoides. Los sinusoides comunican las ramificaciones terminales de la arteria hepática y la vena porta con la vena central, que

representa el comienzo de las venas hepáticas. Entre las placas celulares se encuentran estrechos espacios, por los que transcurren los sinusoides separados de las placas por los espacios de Disse (Geneser, 2008).

2. El lobulillo portal, presenta una arquitectura triangular del parénquima hepático comprendido entre la triada portal central y tres venas centrales dispuestas a la periferia del lobulillo portal, esta concepto morfológico explica el drenaje de la bilis hacia las vías biliares de menor calibre.
3. El acino hepático está constituido por porciones de parénquima hepático de forma romboidal, comprendido entre dos venas centrolobulillares y dos triadas portales. El flujo de sangre arterial dentro de los sinusoides venosos genera gradientes de oxígeno y nutrientes que permite reconocer tres zonas. La zona I, cercana a la triada portal es la más rica en oxígeno y nutrientes, mientras que la III, cercana a la vena central es pobre en oxígeno, y la zona II, ubicada en el centro de las dos anteriores, muestra un contenido de oxígeno y nutrientes intermedio.

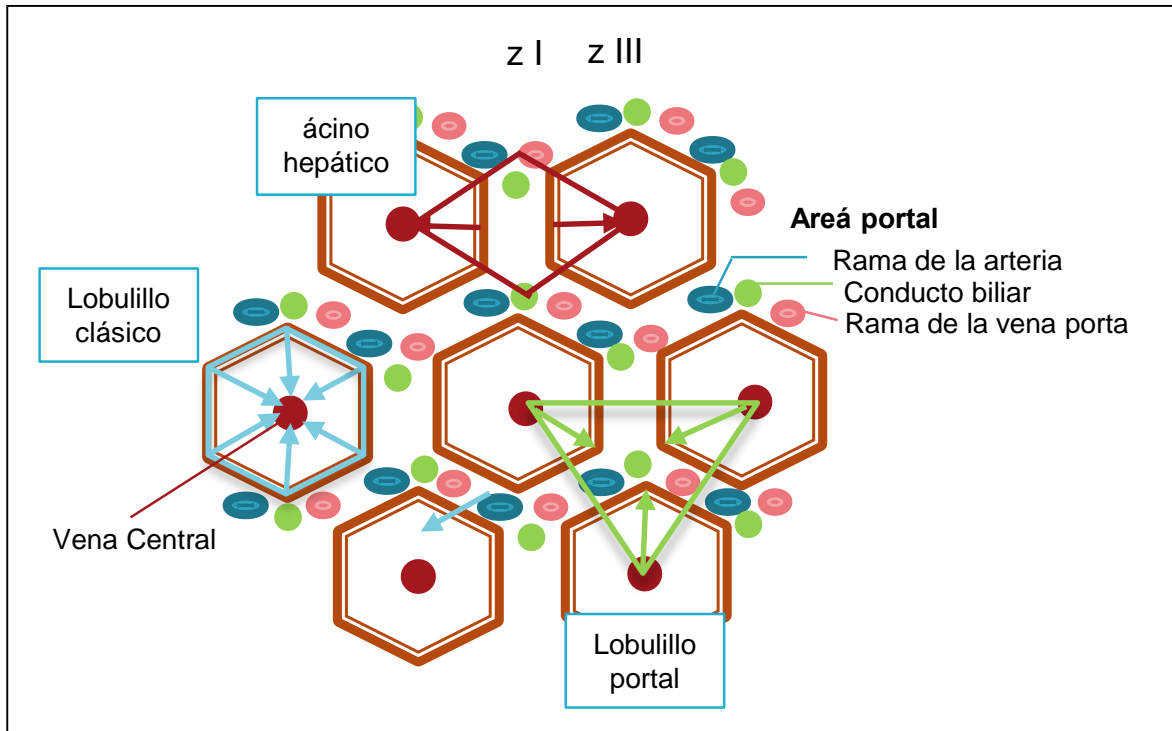


Figura 2. Estructura morfofuncional del parénquima hepático: Lobulillo clásico, lobulillo portal y acino hepático. (Modificado de Gartner y Hiatt, 2008). El lobulillo clásico (azul), el flujo de sangre se da de la periferia a la vena central. El lobulillo portal (verde), región triangular cuyo centro la triada portal y la periferia está limitada por líneas rectas y los vértices del triángulo corresponden a las venas centrales, concepto que explica el flujo de la bilis. El acino hepático, se basa en el flujo sanguíneo de la arteriola de distribución, posee tres regiones concéntricas (Z1: zona rica en oxígeno y nutrientes, Z3: zona deficiente en oxígeno y nutrientes y Z2: zona intermedia).

3.3 Toxicidad de plomo en el hígado

Las principales causas de la toxicidad de plomo en el hígado está relacionada con las funciones que el hígado desempeña, en él se lleva a cabo el almacenamiento, el metabolismo y la biosíntesis de nutrientes (ej. la síntesis y el almacenamiento de glucógeno, el metabolismo de ácidos grasos, la conjugación de lipoproteínas). Por

otro lado, también tiene importantes funciones como la síntesis de proteínas funcionales (ej. enzimas y factores de coagulación de sangre), además, de ser el sitio donde se lleva a cabo el metabolismo de xenobióticos (Hodgson y Levi, 2004; Mudipalli 2007).

Particularmente en hígado, los efectos del plomo en mamíferos han sido ampliamente caracterizados. Los estudios más recientes se presentan en la tabla 1. A la fecha no se han realizado estudios del efecto de plomo incorporado por la vía inhalada. Mani y cols. (2007) hacen un estudio de la ruta de incorporación por inhalación, pero ellos evalúan el efecto de cenizas que contienen una mezcla de metales (Cd, Cr, Cu, Mn y Pb), la concentración que reportan de plomo en las cenizas es de 9.353 µg/g. Los estudios revelaron infiltración de células mononucleares dentro y alrededor de las triadas portales, también reportan cambios necróticos en los hepatocitos.

Tabla 1. Antecedentes de los efectos de plomo, en hígado de rata y ratón.

Cita	Compuesto	<i>In vitro/in vivo</i>	Especie	Vía de exposición	Respuesta
Siegy Billings, 1997	Acetato de Pb 100 U/mL	<i>In vitro</i>	♂ ratón Swiswebster		Disminuye GSH y aumenta el GSSG. Inducción de citocinas por estrés oxidante
Milosevic y Maier, 2000	Acetato de Pb (2 – 50 µM)	<i>In vitro</i>	♂ de rata Sprague-Dawley		Activación de TNF-α en células de Kupffer
Iavicoli <i>et al.</i> , 2002	Acetato de Pb 20 mg/L	<i>In vivo</i>	♀ ratón Swiss	oral	Alteración de la función hepática (ALT, AST, TBIL).
Adegbesan y Adenagua, 2005	Nitrato de Pb 100 µmol/ kg	<i>In vivo</i>	♂ ratas Winstar	intravenosa	Incremento en la peroxidación lípídica, CAT y GSH y disminución de SOD
Berrahal <i>et al.</i> , 2007	Acetato de Pb 15 mg/kg	<i>In vivo</i>	♂ ratas Winstar	Intravenosa	Disminuye SOD y aumenta GPx
Garg <i>et al.</i> , 2007	Acetato de Pb 100 mg /kg	<i>In vivo</i>	♂ de rata Sprague-Dawley	oral	Inhibición de ALT
Agarwal <i>et al.</i> , 2009	Nitrato de Pb 40 µM	<i>In vitro</i>	♂ Ratas		Apoptosis, degradación de DNA inducción de caspasas (H5P70)
Zhang <i>et al.</i> , 2009	Acetato de Pb 500 mg/kg	<i>In vivo</i>	♀ Ratones Kun Moing	Oral	Alteración de la función hepática (ALT, AST, TBIL)

*Abreviaturas: Pb: Plomo, TNF: Factor de necrosis tumoral, ALT: Alanina aminotransferasa, AST; aspartato aminotransferasa, TBIL: Bilirrubina Total, GSH: Glutatión, GSSG: Glutatión disulfuro, CAT: catalasas, SOD: Súper  xido dismutasa, GPx: Glutatión peroxidasa.

3.4 Pruebas de funcionamiento hepático.

Las pruebas de función hepática son pruebas para el seguimiento rutinario de las enfermedades hepáticas en animales y humanos (Ennulat *et al.*, 2010). Las pruebas

de función hepática nos dan cuenta de complicaciones funcionales hepáticas, las cuales se asocian con alteraciones bioquímicas y morfológicas, que son consecuencia de agentes estresores de las células.

La evaluación de la enzima Alanina amino transferasa (ALT), también llamada glutamato piruvato transferasa sérica (SGPT) y la Aspartato amino transferasa (AST) son los dos marcadores más fidedignos de daño hepatocelular o necrosis (Botros y Sikaris, 2013). ALT, además es muy específica de daño hepático ya que está presente principalmente en el citosol de hepatocitos. AST es una enzima no tan específica, la encontramos tanto en el citoplasma como en la mitocondria de diferentes tejidos (hígado, corazón, musculo esquelético, riñón, cerebro, páncreas y pulmón) (Giboney, 2005).

El incremento de estas enzimas se debe a que durante el daño hepatobiliar, los aminoácidos son liberados por la ruptura de los tejidos. Para poder metabolizar estos aminoácidos se requiere incrementar el proceso de transferencia llevado a cabo por las enzimas transferasas (Garg *et al.*, 2006).

La ALT intercambia alanina y piruvato y puede regenerar la glucosa consumida por el músculo, de la misma forma que el lactato intercambia al piruvato en el ciclo de Cori, en el metabolismo anaeróbico (Botros y Sikaris, 2013). El hígado revierte la

transaminación que ocurre en el músculo, la alanina regresa al músculo unida al transportador de glucosa; este proceso de recirculación de glucosa y alanina entre el hígado y el músculo se le conoce como **ciclo de la glucosa-alanina**. La producción de alanina puede llevarse a cabo por la degradación de proteínas y vía transaminación de piruvato por la ALT (King, 2017).

La AST es vital para la glucólisis aeróbica al permitir que el di-nucleótido de nicotinamida (NADH) que se ha generado en el citoplasma se reubique dentro la mitocondria mediante la unión a malato, α – cetoglutarato, aspartato y glutamato. El aspartato se forma en una reacción de transaminación catalizada por la AST. El aspartato α -cetoácido dona su grupo amino al 2-oxoglutarato en una reacción dependiente de Adenosín trifosfato (ATP) (King, 2017).

La relación de la actividad de las enzimas AST y ALT fue descrita en 1957 por Fernando De Ritis y desde entonces se conoce como el radio de De Ritis y forma parte de las pruebas de función hepática de rutina. Las dos enzimas son liberadas al torrente sanguíneo a un ritmo constante y sus niveles habituales representan el equilibrio entre el recambio normal de hepatocitos debido a la muerte celular programada y al aclaramiento de las enzimas del plasma. En un organismo sano la proporción hepática de AST/ALT es de 2.5:1. Sin embargo, debido a que la AST se elimina del suero por los sinusoides hepáticos 4 veces más rápido en comparación

con ALT, los niveles séricos resultantes de AST y ALT son similares (Botros y Sikaris, 2013).

Las alteraciones en la relación AST/ALT pueden darnos indicios de hepatitis A y E. En los casos en los que el paciente presenta una relación de AST/ALT entre 0.5 a 0.7, el paciente presenta un buen pronóstico, en casos en los cuales la relación es mayor a 2 se trata de una hepatitis aguda fulminante. De igual forma en la hepatitis viral crónica (hepatitis B y C) se presentan relaciones menores a 1, pero pueden encontrarse relaciones superiores a 1, lo cual se presenta cuando se da la progresión de fibrosis a cirrosis. En otras enfermedades como la hepatitis alcohólica se observa una proporción entre 1.5 – 2 y en la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), relacionada con la obesidad y la diabetes, también presentan una relación superior a 1 (Llorenc *et al.*, 2008)

La relación AST/ALT es influenciada por variables fisicoquímicas y ambientales. La ingesta de alcohol se relaciona con un incremento de las enzimas, las enzimas también incrementan con el peso corporal y son dependientes del sexo, ya que son más altas en la mujer (Rief, 2016)

3.5 Estrés oxidante y producción de radicales libres

Los organismos aeróbicos utilizan reacciones de óxido – reducción (redox) para producir energía en forma de ATP. Las reacciones redox traen consigo productos

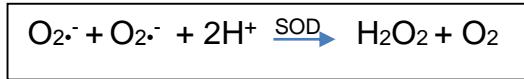
que son altamente tóxicos, los radicales libres. Los radicales libres comprenden a especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS). ROS abarca una variedad de metabolitos de oxígeno reducidos parcialmente (ej. el radical anión superóxido: O_2^- , el peróxido de hidrógeno: H_2O_2 y el radical hidroxilo: OH^\cdot). Bajo ciertas condiciones, puede incrementarse la producción de los radicales libres (Davies, 1995; Martindale y Holbrook, 2002).

El metabolismo aerobio comprende la producción de Acetil Co - A, la oxidación de la acetil Co A, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. La cadena de transporte de electrones se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria a través de 4 complejos enzimáticos. El complejo I o NADH deshidrogenasa, la cual transfiere dos electrones del nucleótido de nicotidaminada (NADH) a la ubiquinona y transloca 4 protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El complejo II, también llamado Succinato deshidrogenasa, este complejo sede dos electrones a la ubiquinona. El complejo III o complejo citocromo bc_1 transfiere dos electrones desde el ubiquinol a dos moléculas de citocromo, a la vez transloca dos protones al espacio intermembrana. El complejo IV o citocromo oxidasa acepta 4 electrones desde el citocromo c y lo transfiere al O_2 (Nelson y Cox 2009).

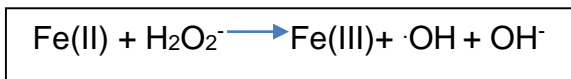
El O_2^- es un producto de la cadena de transporte de electrones donde el oxígeno es reducido a agua, mediante la donación de electrones realizado por los complejos I

y II. El O_2^- se elimina mediante una reacción de dismutación catalizada por la enzima súper-óxido dismutasa (SOD), el resultado de esta reacción es el H_2O_2 .

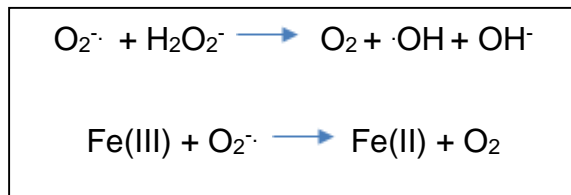
<



Bajo condiciones de estrés, cuando el O_2^- se incrementa, las enzimas que tienen metales (Fe o Cu) son susceptibles de inactivarse, por la oxidación del metal con la subsecuente liberación del Fe y el Cu. El Fe libre puede participar en la reacción de Fenton generando OH^- , un radical altamente reactivo.



El radical superóxido también puede participar en la reacción de Haber-Weiss, que es una combinación de la reacción de Fenton y la reducción del Fe por el superóxido (Liochev y Fridovich, 2002; Jomova y Valko, 2011).



El óxido nítrico (monóxido de nitrógeno, NO) se genera por la oxidación de un átomo de nitrógeno terminal de la L-arginina. Este proceso es catalizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS.) Dependiendo del microambiente el radical NO puede

ser convertido en otras RNS como son el catión nitrosomio (NO^+), anión nitroxilo (NO^-) o peroxinitrito (ONOO^-) (Drögue 2002). Para combatir el efecto perjudicial de los radicales libres, las células poseen enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), la SOD o la glutatión peroxidasa (GPx) (Mouchet *et al.*, 2006). El efecto perjudicial de los radicales libres se conoce como estrés oxidante, y representa un trastorno en el equilibrio entre las reacciones pro-oxidantes/ antioxidantes en los organismos aeróbicos. El exceso de ROS o RNS puede dañar a los lípidos, las proteínas o el DNA, inhibiendo su funcionamiento normal. Los procesos de “regulación redox” controlan el estatus oxido-reductor de la célula (Valko *et al.*, 2007).

Las ROS y RNS interaccionan con los lípidos de la membrana y provocan peroxidación lipídica (ver figura 3). El proceso de peroxidación lipídica es catalizada por un metal redox activo (Fe, Cr, V y Cu) y da como resultado la formación de radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) que pueden reordenarse por ciclación a endoperóxidos. Los productos de los procesos de la lipoperoxidación son en el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal (4HNE) (Jomova y Valko 2011).

Los radicales libres que interactúan más frecuentemente con las proteínas son el $\text{OH}\cdot$ y el NO. Las proteínas más vulnerables al $\text{OH}\cdot$ son la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína (Velázquez *et al.*, 2004). Al

interactuar el OH^\cdot con las cadenas laterales de las proteínas provoca alteraciones en la estructura terciaria que dan como resultado pérdida de la función biológica.

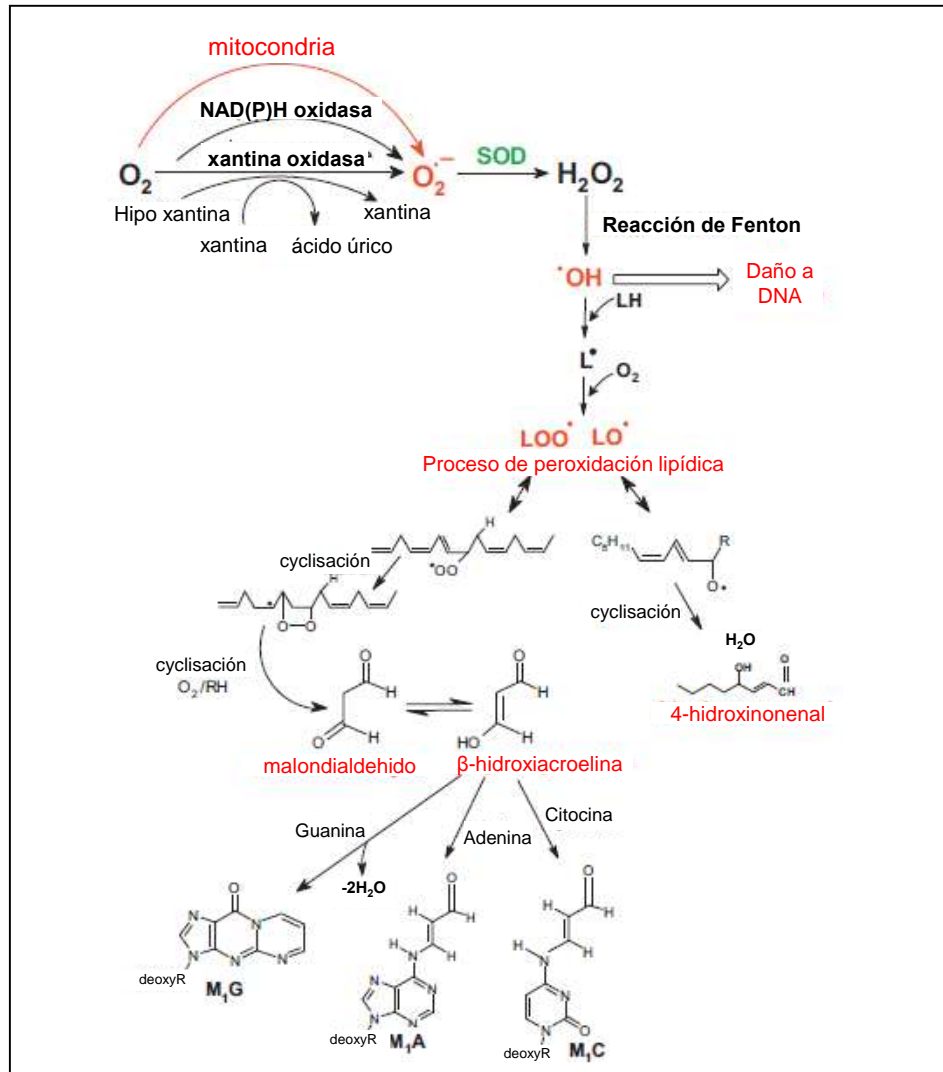


Figura 3. Formación de especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación (modificado de Jomova y Valko, 2011). El súper óxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) es un subproducto de la cadena de transporte de electrones. La Superóxido Dismutasa por reacción de dismutación genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A través de la reacción de Fenton se produce el radical hidroxilo (OH^\cdot), un radical altamente tóxico que interactúa con el material genético y los lípidos de la membrana y genera peroxidación lipídica. Los radicales peróxido (LOO^\cdot y LO^\cdot) se reordenan por proceso de cyclización y los productos son el malondialdehído y el 4 – hidroxinonal. Lo cuales interactúan con las bases nitrogenadas.

La auto-oxidación de las hexosas se genera con la interacción de las proteínas involucradas en el metabolismo de glucosa y los radicales libres. Los derivados de carbonilo, generado por reacciones de oxidación de residuos de aminoácidos, han sido utilizados como indicador de daño oxidativo a las proteínas (Sundari *et al.*, 1997; González –Torres *et al.*, 2000).

Otros marcadores de estrés oxidante son la o-tiroxina y la nitrotirosina, productos de la oxidación de la fenilefrina por el hidroxilo y de la nitración de la tirosina por el óxido nítrico, respectivamente (González-Torres *et al.*, 2000).

Los radicales libres interactúan con las bases nitrogenadas, afectando directamente a los ácidos nucleicos (ver figura 3). La oxidación de la guanina por el OH⁻ tiene como resultado a la 8-hidroxi guanina (8-OH-G), el producto de la oxidación del ácido desoxirribonucleico (ADN) más estudiado a la fecha, de los más de 100 productos de la oxidación de ADN que se conocen, se ha demostrado que estos productos son mutagénicos y carcinogénicos (Dizdaroglu *et al.*, 2002; Jomova y Valko 2011).

A nivel celular, los metales pesados pueden incrementar la formación de las ROS generando estrés oxidante e iniciar la peroxidación lipídica en la mitocondria y finalmente incrementar el citocromo C, el cual constituye uno de los últimos pasos

para el inicio de la apoptosis celular. El estrés oxidante, además, genera daño en el DNA dando lugar nuevamente a muerte celular por apoptosis o necrosis.

3.6 Estrés oxidante y plomo

Para entender el mecanismo por medio del cual el Pb incrementa la producción de ROS, es necesario tomar en cuenta que los metales se dividen en dos grupos de acuerdo a su reactividad en dos grupos (Stohs y Bagchi, 1995; Dunderski, 2004):

- a) Los metales redox-activos (Fe, Cr, V y Cu), que participan en las reacciones redox y están directamente relacionadas con la producción de ROS.

- b) Los metales redox-inertes (Cd, Hg, Ni, As, Pb y el Zn), los cuales no participan directamente en la producción de ROS y presentan un elevado efecto tóxico en los organismos aun en bajas concentraciones.

Hasta ahora no se ha definido un solo mecanismo que explique la toxicidad del plomo. El Pb puede bloquear la activación enzimática, la síntesis proteica, alterar la homeostasis de Ca, compite en la absorción de elementos traza y genera estrés oxidante (Patrick 2006). La toxicidad del Pb en los organismos es usualmente ocasionada por su habilidad para reemplazar a los metales esenciales de enzimas

u otras proteínas celulares o por interactuar con los grupos tiol de las proteínas. Los mecanismos por los cuales el Pb ocasionan su efecto tóxico incluyen (Dunderski, 2004):

- a) La disrupción de la estructura y funciones biológicas de muchas proteínas debido a la alta afinidad por sus grupos sulfhidrilo libres.

El Pb, remplace a iones divalentes (Calcio y Zinc) que se unen a los sitios activos de proteínas con grupos sulfhidrilo, alterando la fisiología celular. Esta alteración en la estructura es debido a que las cargas eléctricas del calcio y el zinc se distribuyen en forma esférica alrededor del ion y favorecen un arreglo regular en los grupos que lo coordinan. A diferencia del Pb donde la distribución de las cargas es irregular debido a la presencia de un par inerte de electrones en uno de sus orbitales (Garza 2004). Ejemplos de proteínas con alta afinidad por el Pb son la proteína de vesícula sináptica (sinaptotagmina) y ALAD (Godwing, 2001).

- b) La generación de efectos pro-oxidantes, los cuales son agravados ya que los metales inhiben enzimas antioxidantes y agotan el glutatión intracelular.

El plomo no sufre reacciones de óxido-reducción en los organismos, pero tiene la capacidad de alterar el sistema de óxido reducción a través de tres mecanismos, en la figura 4 se resumen los mecanismos de daño oxidante inducidos por el plomo:

a) La generación de ácido δ -aminolevulinico (δ -ALA).

La enzima δ -ALAD es inhibida por el plomo, provocando un incremento en δ -ALA, la cual se auto-oxida y da lugar a la formación de ROS (Flora *et al.* 2007). El aumento en las ROS trae como consecuencia daño celular a diferentes niveles celulares.

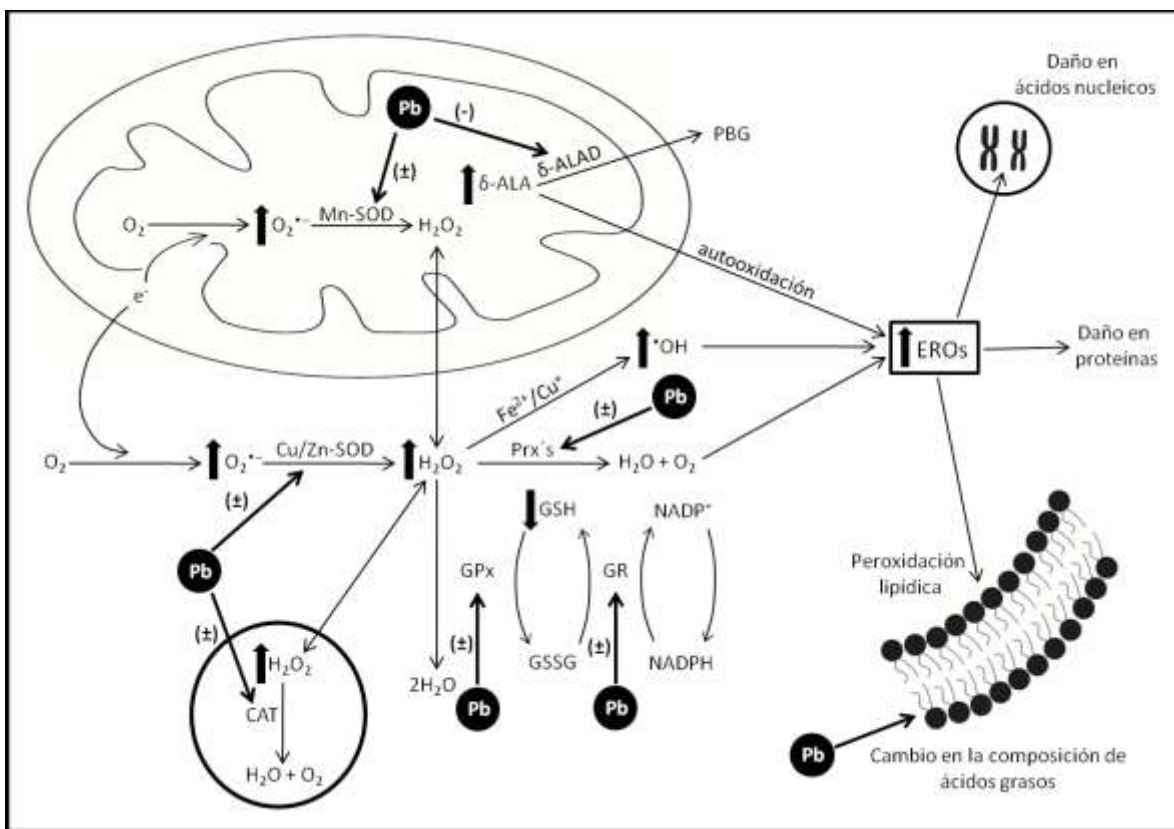


Figura 4. Mecanismos involucrados en el daño oxidante celular inducido por plomo (Pb). (Martínez *et al.*, 2011). En bajas concentraciones de Pb se incrementa la actividad del sistema antioxidante celular, a elevadas concentraciones inhibe la actividad de enzimática de la Catalasa (CAT), Glutatión peroxidasa (GPx) y la peroxidorrredoxina (Prx's), lo que lleva a un incremento de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y favorece su conversión a radical hidroxilo ($\cdot OH$) mediante la reacción de Fenton. Por otra parte, el efecto inhibitorio de altos

niveles de plomo (Pb) sobre el ácido aminolevulinico (δ -ALAD), la glutatión reductasa (GR) y los subtipos de la súper óxido dismutasa (SOD) favorece el incremento de radicales libres, disminuye las reservas de GSH e impide la eliminación de oxígeno (O₂).

El aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducirá daño celular a diversos niveles, efecto que incrementara por la capacidad del Pb de alterar la integridad de la membrana plasmática, lo que hace a la célula más susceptible al estrés oxidativo. (-): efecto inhibitorio; (±): efecto estimulante o inhibitorio dependiente de la concentración de Pb; ↑Incremento ↓Disminución.

b) La Inducción de peroxidación lipídica.

El Pb altera la estructura y la función de las membranas celulares por aumento en los niveles de ROS. Además, el Pb modifica la composición de ácidos grasos y altera la actividad enzimática en las membranas celulares. El plomo se ha asociado con alteraciones de la actividad de la acetilcolinesterasa, elevación en los niveles de Ca y disminución en la fluidez de membranas celulares (Kharoubi *et al.* 2008). En células de hígado y riñón se ha encontrado incremento en los niveles de sustancias reactivas con el ácido tiobarbiturico (peroxidación lipídica)

c) La disminución de sulfhidrilo (SH) y enzimas antioxidantes.

El Pb inactiva al GSH, inhibe la actividad reductora de glutatión reductasa (GR) al unirse a los grupos SH; la GR también inactiva a la glutatión peroxidasa GPx), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la glutatión-S-transferasa (GST). Otras enzimas que no involucran GSH como sustratos, como las CAT y la SOD también se alteran.

Cuando los sistemas involucrados en la metabolización de H_2O_2 se alteran, se favorece su conversión a $\bullet OH$ mediante la reacción de Fenton.

El tipo de alteración observado en las enzimas, dependerá de la concentración de Pb. A concentraciones bajas se ha informado que incrementa la actividad enzimática (Gurer *et al* 2004; Abdel *et al.*, 2010). Sin embargo, también se ha encontrado incremento de los niveles de GST, por un mecanismo independiente de estrés oxidante. Daggett y *cols.* 1998, informaron un aumento en la concentración de GST en hígado y riñón, como consecuencia de un mecanismo transcripcional alterado.

Cada uno de estos factores promovidos por el Pb, se suman al generar daño celular, ya que el efecto inhibitorio de altos niveles de Pb sobre δ -ALAD, GR y SOD incrementa los radicales libres, disminuye las reservas de GSH e impide la eliminación de O_2^- . El aumento de ROS inducirá daño celular a diversos niveles, efecto que se potenciará por la capacidad del Pb de alterar la integridad de la membrana plasmática, lo que hace a la célula más susceptible al estrés oxidante.

3.7 Los antioxidantes

Todos los organismos aeróbicos utilizan una serie de defensas antioxidantes para la protección celular las cuales están encaminadas a la remoción del agente

oxidante y a reparar enzimas y/o moléculas que han sido alteradas (Davies, 1995). De acuerdo con Halliwell y Gutteridge (1989), los antioxidantes se definen como sustancias capaces, en concentraciones relativamente bajas, de competir con otros sustratos oxidantes y de este modo, reducir o inhibir significativamente la oxidación

Los antioxidantes se clasifican de acuerdo con su función en:

Primarios. Previenen la formación de radicales libres evitando daño oxidativo. Se han propuestos dos mecanismos de acción, para explicar su funcionamiento:

- a) Descomposición enzimática de los hidroperóxidos formados y el H₂O₂ generado;
- b) quelación de iones metálicos.

Secundarios. En el segundo nivel de protección, los antioxidantes tienen la función de atrapar a los radicales libres que se han formado, impidiendo el inicio de la cadena oxidativa o la interrupción de su propagación. Dependiendo de su solubilidad se dividen en hidrosolubles como la vitamina C (ácido ascórbico) o el ácido úrico y liposolubles como la vitamina E y la melatonina,

Terciarios. Lo conforman enzimas que restauran las biomoléculas a su conformación nativa y enzimas catabólicas encargadas de degradar las moléculas no funcionales. La degradación incluye remoción del citosol y disminución de precursores que pueden volverse a sintetizar. Dependiendo del tipo de molécula en la que actúan se dividen: Reparadores de lípidos (fosfolipasas, GPx, GST y acetiltransferasas), reparadores de proteínas (proteinasas, proteasas, peptidasas) y reparadores de ácidos nucleicos (exonucleasas, endonucleasas, glicosilasas, polimerasa y ligasas) (Noguchi y Niki 1999).

Los antioxidantes también se clasifican de acuerdo con su origen en endógenos y exógenos. Los antioxidantes endógenos, a su vez se clasifican dependiendo de su naturaleza en: enzimática y no enzimática; los antioxidantes de naturaleza no enzimática se dividen dependiendo de su solubilidad en hidrosolubles y liposolubles. Los antioxidantes exógenos se clasifican de acuerdo a su solubilidad en hidrosolubles y liposolubles.

En las células y los fluidos corporales existen muchos **sistemas enzimáticos** que controlan los niveles de especies reactivas. Las tres clases de enzimas antioxidantes más conocidas son la SOD, LA CAT y la GPx. Las funciones centrales que indirectamente llevan a cabo las enzimas antioxidantes son: (a) La defensa; por ejemplo la reposición de GSH desde glutatión disulfuro (GSSG) por la flavoproteína Gr y (b) El transporte y eliminación de compuestos reactivos; ejemplos de ellos son la GST y el sistema de transporte del glutatión S-conjugado. Los distintos tipos celulares así como diferentes sitios subcelulares pueden contener una cantidad variable de enzimas antioxidantes (Soboll *et al.*, 1995; Sies, 2008).

Todos los miembros de la familia de la SOD utilizan metales de transición en sus sitios activos. Las bacterias emplean a la Fe-SOD y la Mn-SOD, mientras que los organismos superiores utilizan distintas formas citoplasmáticas como Cu, Zn-SOD o mitocondriales como Mn-SOD. El producto de la oxidación de O_2^- , llevado a cabo

por la SOD es H_2O_2 , el cual es altamente tóxico y su rápida remoción es catalizada por las GPx y CAT. Ambas enzimas oxidan el H_2O_2 a agua y oxígeno. La GPx utiliza el poder reductor del GSH, un tripéptido constituido de L- γ -glutamil-L-cisteinil glicina, para oxidar el H_2O_2 . La porción sulfhidrilo de los residuos de cisteína suministran los equivalentes reductores para la actividad de la GPx. En la reducción de una molécula de H_2O_2 , son oxidadas dos moléculas de GSH para formar GSSG, un compuesto disulfuro. La enzima Gr utiliza NADPH para reducir una molécula de GSSG a dos moléculas de GSH, permitiendo de este modo la acción continua de la GPx (Davies, 1995).

Los mecanismos de acción de la CAT son aparentemente mucho más simples que los de la GPx. Se ha descrito que la CAT requieren dinucleótido de nicotinamida/nucleótido de nicotinamida fosfato (NADH/NADPH) para su operación continúa, aspecto que no ha sido completamente aceptado. A la vez, la CAT presenta un comportamiento interesante ya que no siguen la cinética clásica de Michaelis-Menten. De manera general, la CAT actúa en la remoción de elevadas producciones de H_2O_2 , inducidos por la oxidación de xenobióticos, mientras que la GPx remueven bajos niveles de H_2O_2 generados por el metabolismo celular y la oxidación de la hemoglobina. En muchos tipos celulares la CAT se encuentran exclusivamente en los peroxisomas donde tienen una clara función en la remoción del H_2O_2 generado por la β - oxidación de largas cadenas de ácidos grasos. De esta forma, se propone que la enzima GPx fundamentalmente actúa con el H_2O_2 citoplasmático

y la CAT actúa con él H_2O_2 que se encuentra dentro de los peroxisomas (Davies 1995).

Los compuestos de naturaleza **no enzimática** interceptan grupos oxidantes y así previenen reacciones deletéreas en la célula, proceso denominado “desactivación”. Para los radicales, la desactivación final consiste en la formación de productos finales no radicales y no reactivos. La transferencia de los radicales de un blanco más sensible a un compartimiento de la célula en el cual un cambio oxidante es menos deletéreo, es también un objetivo importante en la transferencia de electrones (Davies, 1995; Sies, 1997). En los sistemas biológicos, la forma más eficiente de interceptar compuestos oxidantes combina las propiedades óptimas de los compuestos no enzimáticos: por un lado los antioxidantes reaccionan con radicales libres y por otro, los antioxidantes son capaces de interactuar con compuestos solubles en agua para ser regenerados (Sies, 1997).

Entre los compuestos antioxidantes de naturaleza **no enzimática**, destacan la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el ácido úrico, el GSH y la ceruloplasmina; otros agentes liposolubles también desempeñan un papel antioxidante en la célula, tales como el β -caroteno y la ubiquinona (Davies, 1995). La quelación de metales es la mejor forma de controlar la peroxidación lipídica y la fragmentación de DNA (procesos que conducen a la formación de radicales libres); así, la prevención inicial de reacciones en cadena incluye la unión de iones metálicos, en particular iones de hierro y cobre. Las metaloproteínas (proteínas de

unión a metales) como la ferritina (se une al hierro), la ceruloplasmina (se une al cobre en el plasma), la transferrina y las metalotioneínas, son de importancia central en el control de reacciones que potencialmente pueden generar radicales libres de potencial oxidante (Davies, 1995; Sies, 1997).

La vitamina E (α - tocoferol) reacciona con una variedad de radicales, generando el radical cromanoxil ($\alpha T - O$). La reacción es formalmente considerada como una transferencia de un átomo de hidrogeno; sin embargo la transferencia del electrón es favorecida en un medio no polar (como son lípidos y membranas), seguida por la desprotonación del radical catión antioxidante en una reacción con H_2O inmersa en la fase lipídica. El HO^*_2 , (pero no el $O_2^{\bullet-}$) reacciona con α - tocoferol ($\alpha T - OH$) y su análogo soluble al agua Troxol (Cadenas, 1995). A la vez, el ácido ascórbico actúa mediando la transferencia de electrones recuperados por la vitamina E y también reacciona con ROO^* , con compuestos de tripletes de carbonilo, O_2^- , $O_2^{\bullet-}$ / HO_2^* , y con los compuestos oxi-férricos en la ferrimioglobina (Cadenas, 1995).

Por otro lado, el ácido úrico (producto final del metabolismo de las purinas) participa como un antioxidante suicida clásico. Por la unión a fierro y/o cobre, el ácido úrico puede inhibir la reacción de oxidación catalizada por metales (Davies, 1995).

3.8 Terapia en la intoxicación por plomo

Los agentes quelantes se utilizan ampliamente para el tratamiento por intoxicación por plomo, los más utilizados son etilendiaminotetraacetato de calcio disódico (CaNa₂EDTA), el ácido meso 2,3 – dimerocaptosuccínato (DMSA) y la D – penicilamina y british anti – lewista (BAL) (Poma P A, 2008; Valdivia M 2011). Debido a los efectos adversos de estos agentes, la terapia mediante quelación del plomo ha dado un giro y se propone a los antioxidantes como una nueva estrategia para revertir la disponibilidad del metal y su toxicidad (Flora *et al.*, 2008).

Estudios recientes orientados a contrarrestar los efectos dañinos del plomo emplean antioxidantes. La terapia antioxidante tiene como finalidad neutralizar los radicales libres y disminuir la producción de ROS, además muchos de los antioxidantes utilizados poseen capacidad quelante del Pb. Por lo que se ha propuesto a los antioxidantes como apoyo en el tratamiento para contrarrestarlos los efectos inducidos por Pb.

Algunos de los compuestos antioxidante utilizados en la terapia para la intoxicación con plomo son el la N – acetilcisteína, el selenio (Se), la vitamina E, el zinc y el β – caroteno (Martínez *et al.*, 2011).

El Zn y el Se son metales esenciales en el organismo y se ha visto la capacidad del Zn de revertir la inhibición de δ – ALAD y el incremento de δ – ALA causados por el Pb y los efectos en sistema nervioso central (Batraa *et al.*, 1998; Moshtaghie *et al.*, 2007). El Se es un metal requerido por la enzima GPx y forma complejos con el Pb;

en niños expuestos a Pb se observó una correlación inversa entre el Pb y el Se (Osman et al 1998).

La N-acetilcisteína reduce los efectos dados al incrementarse δ – ALA disminuye los niveles de 3,4-metilendioxianfetamina (MDA) y regula la relación GSH/GSSG, en ratas expuestas a plomo (Gurer y Ercal, 2000; Pande et al., 2001).

3.9 S-Alilcisteína

Los efectos antioxidantes y protectores del extracto de ajo son conocidos por su respuesta bajo condiciones de estrés. La S-alilcisteína (SAC) forma parte de los compuestos del extracto del ajo, y es la molécula de organosulfuro más abundante en el ajo. La SAC se obtiene a partir del proceso conocido como “extracto de ajo envejecido” (AGE, por sus siglas en ingles). La extracción se efectúa en etanol al 15-20% a temperatura ambiente, de esta forma se obtienen de forma natural y se transforman en compuestos de azufre estables (Corzo-Martínez *et a.*, 2007). A partir del AGE se obtiene la SAC un compuesto soluble en agua, con un elevado potencial antioxidante por sus abundantes grupos sulfhidrilo (Geng et al., 1997; Kim et al., 2001; Numagami y Ohnishi, 2001; Pérez-Severiano, 2004).

La SAC es un antioxidante exógeno, sus características químicas son: alta solubilidad, biodisponibilidad, baja toxicidad (CL₅₀ de 500 mg/kg) y fácil absorción (Kodera *et al.*, 2002; Herrera – Mundo *et al.*, 2009). Además, su alta capacidad antioxidante se debe a que captura especies reactivas (O₂⁻, H₂O₂, OH⁻), estimula la

síntesis de GSH y actúa como un compuesto que mimetiza al GSH (Macan *et al.*, 2006; Kodai *et al.*, 2007; Herrera – Mundo *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010).

Hasta el momento se ha informado su empleo en casos de cáncer gástrico, pancreático, leucemia mieloide aguda con muy buen resultado, por lo que la SAC se ha propuesto como un fuerte apoyo junto a los tratamientos de quimio y radioterapia. Además, se ha demostrado que la SAC modula la actividad de enzimas importantes la GST y el citocromo P450 (CYP), en el estómago, hígado y pulmón de ratones. Pinto y cols. (1997) observaron un incremento en la síntesis de GSH y un incremento en la enzima GST (Hotono *et al.*, 1996). Además, la SAC es efectiva en la captación de radicales libres (Imai *et al.*, 1994; Rivas 2016).

4. Planteamiento del problema.

El plomo se encuentra presente en la atmósfera de la Ciudad de México, (García *et al.*, 2009; Adachi y Buseck 2010) y en los cigarrillos consumidos por los fumadores (Verma *et al.*, 2010). Por otro lado, mucho se ha publicado sobre los efectos del Pb, cuando éste ingresa por vía oral, pero no se sabe los cambios que ocurren en el hígado, cuando el Pb ingresa a través de la vía inhalada. A la fecha no se han generado estudios del efecto del plomo en hígado de mamíferos, donde la ruta de exposición sea la inhalación, la cual representa una de las principales vías de ingreso del Pb a los organismos y que pueden favorecer la intoxicación por este metal.

Por lo expuesto anteriormente, el presente estudio determinó el efecto de la incorporación del Pb en tejido hepático, a través de la inhalación del metal, evaluando el daño histológico en este órgano. Se emplearon marcadores inmunohistoquímicos para identificar la participación del estrés oxidante (4-hidroxinonenal y nitrotirosina) y la actividad de enzimas antioxidantes. También se utilizaron las pruebas de función hepática para determinar el deterioro funcional del hígado.

Adicionalmente, se determinó el efecto protector de la administración oral de la SAC, como un antioxidante exógeno sin efectos tóxicos reportados a la fecha.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general.

- Evaluar los cambios morfofuncionales en el hígado por la inhalación de Pb en un modelo experimental en ratón, así como evaluar el efecto protector antioxidante de la SAC.

5.2 Objetivos particulares

- a) Cuantificar la concentración de Pb en hígado y sangre.
- b) Identificar los cambios histológicos producidos por el Pb en el hígado y el con la técnica histológicas habitual.

- c) Identificar la presencia de 4HNE y nitrotirosina, generados como marcadores de estrés oxidante, ante la exposición a Pb.
- d) Evaluar las alteraciones provocadas por la inhalación de Pb, en la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx, Gr y CAT), en el tejido hepático de ratón.
- e) Evaluar el efecto de la inhalación de Pb en la función hepática.
- f) Comparar los cambios observados en relación con el tiempo de exposición.
- g) Identificar la capacidad protectora de SAC ante los cambios histológicos producidos por el Pb en el hígado, con la técnica histológica habitual.
- h) Identificar la capacidad protectora y antioxidante de SAC, ante la presencia de 4-HNE, por la exposición a Pb.
- i) Evaluar el efecto protector de SAC en los cambios producidos por la inhalación de Pb en la actividad de las enzimas antioxidantes.
- j) Evaluar el efecto protector de SAC ante la exposición a Pb en la función hepática.

6. Hipótesis.

La inhalación de plomo inducirá cambios morfológicos y funcionales generados por estrés oxidante, que se prevendrá con la administración de un antioxidante exógeno (SAC).

7. Metodología

7.1 Reactivos.

Tabla 2. Lista de Reactivos.

Reactivo	Fabricante
Estándar de Pb	Wisconsin State Laboratory of Hygiene, Madison, WI, EUA
Acetato de plomo	Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA
Declere	Cell Marque, Rocklin, CA, EUA
H ₂ O ₂	JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA
Anti 4 – HNE	ID laboratory, Melbourne, AU
Nitrotirosina	Abcam laboratory, Cambridge; MA, EUA
Anti – conejo	Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, EUA
Complejo estreptavidina – HRP	Dako, Santa Clara, CA, EUA
3,3 – diaminobencidina (DAB)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas , TX, EUA

7.2 Diseño experimental.

Se utilizaron 60 ratones macho adultos de la cepa CD-1 (Peso 33±3 g). Se dividieron al azar en cuatro grupos de 15 ratones cada uno. El grupo I, control, inhaló solo solución salina una hora, dos veces por semana durante un período de 8 semanas (Fortoul y cols., 1999, 2005); Grupo II y III, inhaló acetato de Pb [0,1 M] con el mismo protocolo que el grupo I, durante 4 y 8 semanas, respectivamente. Grupo IV después de las 8 semanas de exposición se suspendió y se permitió una

recuperación de 4 semanas. Grupo V y VI, solo se administró el antioxidante (SAC) disuelto en agua en una dosis de 10 mg/kg de peso, durante 4 y 8 semanas, respectivamente. Grupo VII y VIII, se administró SAC, al igual que los grupos V hora antes a la exposición al Pb en la misma concentración que el Grupo II, durante 4 y 8 semanas, respectivamente. Posteriormente se sacrificaron como lo indica la **NOM-062-ZOO, 1999**. El proyecto se registró en la Comisión de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina con el número #04-2005

Después de haber sido expuestos a la inhalación, los ratones se colocaron nuevamente en a sus cajas y se alimentaron con pellets (Purina comida para ratas) y agua *ad libitum*. La exposición se llevó a cabo durante una hora dos veces por semana (16 exposiciones, los ratones se sacrificaron con Pentobarbital sódico (3 mL por ratón; Holanda Animal Health) cada 4 semanas para análisis histológico, inmunohistoquímico y bioquímico. Los animales se perfundieron con solución salina seguido de paraformaldehído al 4%, asimismo se extrajo la sangre para la evaluación de las enzimas hepáticas.

7.3 Determinaciones de las concentraciones de plomo en hígado y sangre.

La concentración de Pb en sangre y en el hígado se determinó en todos los grupos: los ratones del grupo control y los que se expusieron durante 4 y 8 semanas (grupo I y grupo II, respectivamente). Así mismo el grupo en recuperación que fueron los

que no habían inhalado Pb durante 4 semanas después del tiempo de exposición de 8 semanas (grupo III). Los tejidos (sangre e hígado) se colocaron en agua desionizada y se mantuvieron a -60 °C hasta su análisis. La sangre se digirió con ácido nítrico en una proporción de 1:4 y se centrifugó a 26916 g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se almacenó a -60 °C hasta su análisis. El hígado se digirió mediante la adición de 5 mL de ácido nítrico en peso húmedo de tejido y se colocó en agua a 80 °C durante dos horas. Después de la digestión, la solución se almacenó en tubos herméticos a 4 °C hasta su lectura. Para la concentración de Pb en sangre y en el hígado, se midió con el Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA) en un horno de grafito acoplado (Analyst 600 con automuestreador AS800, Perkin Elmer). Como control de calidad, se utilizaron los estándares de Pb y se realizaron las curvas de calibración respectivas, obteniendo una correlación de 0.9995 y un límite de detección de 0.5 ppb para la curva de calibración para la evaluación de la concentración de Pb en sangre y 0.9991 y límite de detección de 1 ppb para la evaluación de la concentración de Pb en hígado.

7.4 Análisis histológico.

Las muestras de tejido se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina & eosina (HE) y Tricrómico de Masson. La tinción de Tricrómico de Masson se utiliza para hacer la identificación y cuantificar la presencia de fibras de colágeno, las cuales se observan en tejido fibroso. La evaluación histológica consideró la presencia de edema; infiltrado inflamatorio, su ubicación y tamaño del núcleo. El análisis se realizó con un microscopio BX51 (Olympus, América, Cd. de México) acoplado a cámara digital (Evolution MP Color, Media Cybernetics, Rockville, MD).

Cinco campos de cada diapositiva se obtuvieron al azar. Se preparó un portaobjetos por ratón y se analizaron tres ratones de cada grupo. Se contaron 75 núcleos, para cada grupo. Las microfotografías se tomaron a 40X. Las mediciones se realizaron con el software Image J (NIH, Bethesda, MD). El rango normal del tamaño del núcleo en el hepatocito es de 7 – 10 μm (Jago 1969; Svoboda et al., 1971).

7.5 Evaluación de la función hepática (PFH).

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción intracardiaca al inicio del estudio, a las cuatro y a las ocho semanas de la exposición y cuatro semanas de recuperación después de la exposición. Las muestras se centrifugaron a 1077 g durante 8 minutos a temperatura ambiente. El suero se separó y se analizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un sistema automatizado Mark LX20 (Automate Sample Processing System, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EUA). Se obtuvieron las concentraciones de alanina aminotransferasa (ALT, IU/L), aspartato aminotransferasa (AST; IU/L) y lactato deshidrogenasa (IU/L LDH) y se calculó la relación de De Ritis (AST/ALT) (Brotos et al; 2013).

7.6 Determinación de 4-Hidroxinonenal por inmunohistoquímica.

Los anticuerpos que se utilizaron fueron

- a) Anti-4Hidroxinonenal (4-HNE), el cual es un aldehído generado por la exposición de los ácidos grasos poliinsaturados por peróxidasas y ROS.

b) Nitrotirosina. La nitrotirosina se emplea como un marcador de la formación de peroxinitrito.

Los tejidos se desparafinaron, y se lavaron con agua destilada. La exposición del epítipo se obtuvo mediante incubación en Declere al 10% a 15 psi durante 3 min.; seguido de tres lavados de cinco minutos cada uno con PBS (solución salina amortiguada con fosfato) Tritón - albumina (10%) en una cámara húmeda. La peroxidasa endógena se inhibió con H₂O₂ al 3% durante 40 minutos y se realizaron lavados con PBS Tritón durante 5 minutos y luego con PBS Tritón-albúmina (10%) por 10 minutos. Los tejidos se incubaron a 37 °C durante una hora con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti 4-HNE en una dilución 1:1000 y nitrotirosina a una dilución 1:100. Se continuó con lavados por cinco minutos en PBS Tritón y en el cuarto lavado se realizó con PBS Tritón -albúmina; A continuación los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución de 1:400 a 37 °C durante 30 minutos. En seguida se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS Tritón. Los tejidos se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con el complejo de estreptavidina-HRP. Se realizaron tres lavados más con Tritón-PBS durante 5 minutos cada uno. Las muestras se revelaron con 50 µl de peróxido de hidrógeno y 3,3-Diaminobencidina (DAB). Los tejidos se contrastaron con HE y después se deshidrataron con baños consecutivos de alcohol y finalmente se montaron con resina para ser analizadas por microscopia de luz.

7.7 Determinación de las enzimas antioxidantes endógenas.

La actividad de enzimas antioxidantes endógenas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasas) en el hígado se determinó en todos los grupos: los ratones del grupo control y los que se expusieron durante 4 y 8 semanas (grupo I y grupo II, respectivamente), asimismo el grupo en recuperación que fueron los que no habían inhalado Pb durante 4 semanas después del tiempo de exposición de 8 semanas (grupo III). El tejido hepático se colocó en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -60 °C hasta su análisis.

La actividad total de la enzima antioxidante SOD se determinó por medio del método que utiliza el sistema xantina – xantina oxidasa para reducir Nitro blue tetrazolium (NBT). La densidad óptica se evaluó a 560 nm (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000). La actividad de la GPx se evaluó por el método descrito por Pedraza-Chaverri y *cols.* (2001). En donde, el tejido previamente homogenizado, reacciona con la mezcla conformada de fosfato de sodio, ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), azida de sodio, Gr y GSH. La actividad enzimática se evaluó a una absorbancia de 340 nm. La actividad de la CAT se evaluó por el método de Aebi (1974), basado en la disipación de 10 mM de H₂O₂ a 240 nm (Pedraza *et al.*, 1999). Finalmente la actividad de la Gr se evaluó de acuerdo al método planteado por Maldonado y *cols.* 2003 que evalúa el consumo de NADPH.

7.8 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron en media \pm error estándar de la media ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por la prueba post-test de *Tukey*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores con una $p < 0.05$. La relación entre la concentración de plomo en sangre y en hígado, se evaluó con el coeficiente de correlación de Pearson (Zar, 1984). El análisis se procesó con el programa SPSS 11.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, EUA).

8. Resultados.

8.1 Concentración de plomo.

Las concentraciones de Pb en el hígado y en la sangre de los tres grupos experimentales revelaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control. La concentración de Pb en el hígado del grupo control fue indetectable, mientras que en los dos grupos expuestos (4, 8 semanas) aumentó con el tiempo de exposición ($p < 0.05$, ANOVA; *Tukey*). Esta relación tiempo-exposición también se observó en la sangre (Tabla 2). En el grupo en el que se suspendió la exposición al Pb, su concentración en la sangre fue similar a la del grupo control (datos no presentados).

Tabla 3. Concentración de Pb en sangre y tejido hepático

Grupos	Sangre ($\mu\text{g/dL}$)	Hígado ($\mu\text{g/g}$)
I	0.22 ± 0.99^a	nd
II	218.76 ± 42.82^b	3.39 ± 0.27^b
III	287.06 ± 16.05^b	6.64 ± 0.25^c
IV	58.34 ± 10.37^c	1.18 ± 0.11^d

Grupo I es el control, grupo II y III corresponden a los ratones expuestos al plomo durante 4 y 8 semanas, respectivamente; grupo IV incluye ratones con 4-semanas de recuperación después de suspender la exposición al Pb. Los resultados se expresan media \pm SEM. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, comparados con el grupo control ($p < 0.05$), $n = 5$. nd: no detectado

8.2 Cambios histológicos.

Los cambios histológicos en el hígado de ratones expuestos a plomo se observan en la Figura 5. El tejido hepático presenta cambios regenerativos y en la arquitectura de los lobulillos hay pérdida de la distribución radial de los hepatocitos y proliferación de éstos de manera inespecífica; disminución del número de sinusoides; células binucleadas, núcleos picnóticos y anisonucleosis evidente en la relación núcleo-citoplasma incrementada y presencia de infiltrado inflamatorio que aumenta conforme las semanas de exposición lo hacen también (figura 5C y 5D).

A las ocho semanas de exposición, es evidente la dilatación de las venas hepáticas terminales y de las ramas de la vena porta (figura 5), así como cambios en los patrones sinusoidales de la disposición de hepatocitos y presencia de esteatosis (vacuolas con lípidos), apoptosis y fibrosis leve (figura 5F). Además, el infiltrado inflamatorio es abundante con predominio de linfocitos y neutrófilos, localizado cerca al área de la vena central y en algunos casos, produce disrupción de las placas limitantes. En los ratones de recuperación después de la exposición, no se observaron cambios inflamatorios o fibrosis.

Los ratones a los que se les administró el antioxidante (SAC) no presentaron alteraciones histológicas. Así mismo, los ratones que recibieron el antioxidante y se expusieron al plomo no presentaron alteraciones histológicas (datos no presentados).

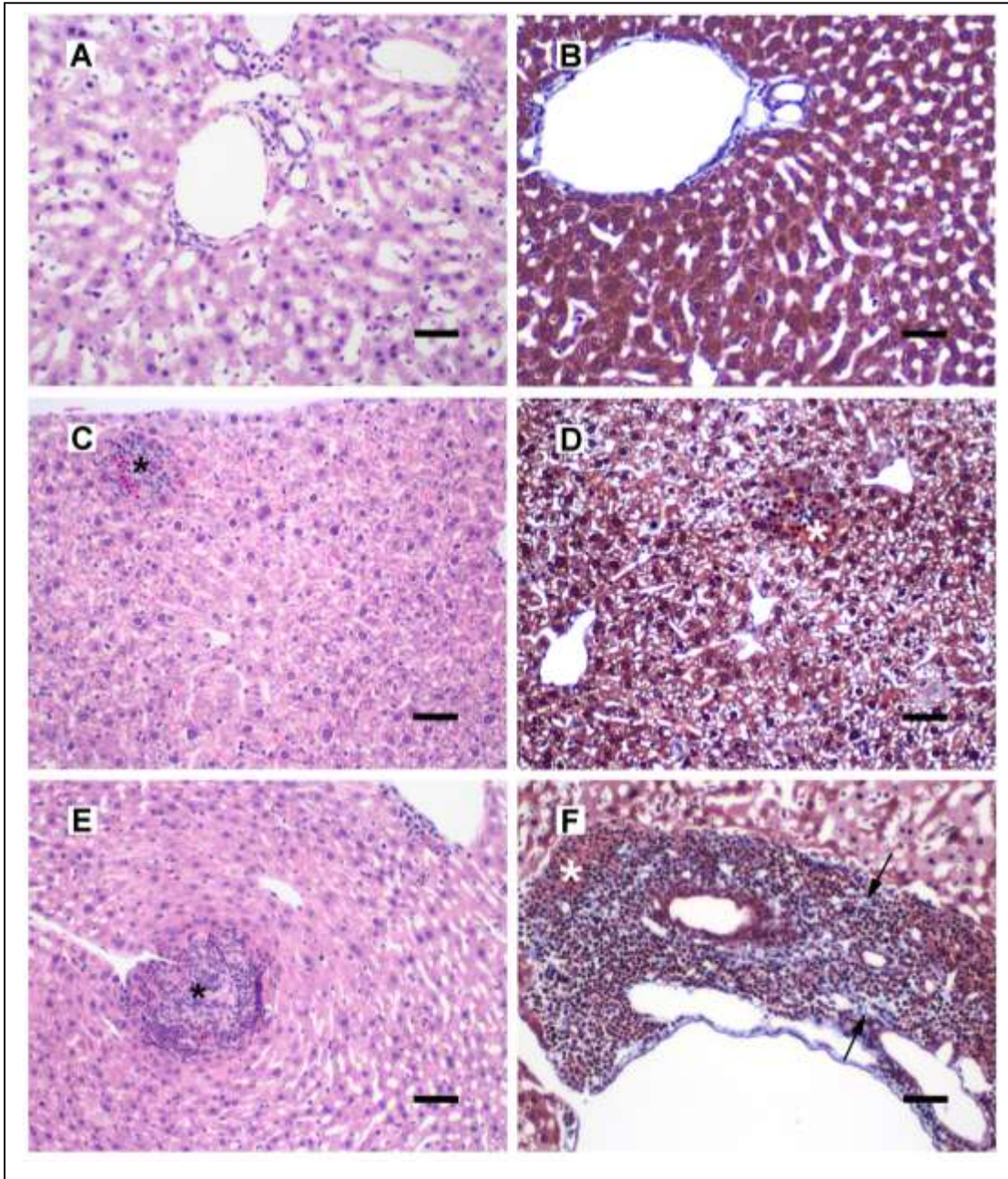


Figura 5. Cambios histológicos en el hígado de ratón. (A) y (B) se observa el hígado de los ratones control (Grupo I); (C) y (D) fotomicrografías de hígado de ratón expuesto a plomo por 4 semanas (Grupo II). (E) y (F) A las 8 semanas de exposición (Grupo III), se observa presencia de infiltrado inflamatorio con neutrófilos y linfocitos; (A), (C) y (e): H&E y (B), (D) y (F): Tricrómico de Masson. Nota: infiltrado inflamatorio (*) y fibrosis (→). Barras de escala 30 μ m. Pb: Plomo.

Se observó un incremento en la presencia de hepatocitos con meganúcleos desde la primera semana de exposición (figura 6 y 7), lo cual aumentó durante las siguientes semanas. El porcentaje de hepatocitos con meganúcleos del grupo con recuperación de 4 semanas no tuvo diferencia significativa con el grupo control (figura 6(b)), pero fue estadísticamente significativo con los grupos expuestos al Pb ($p < 0.05$. ANOVA).

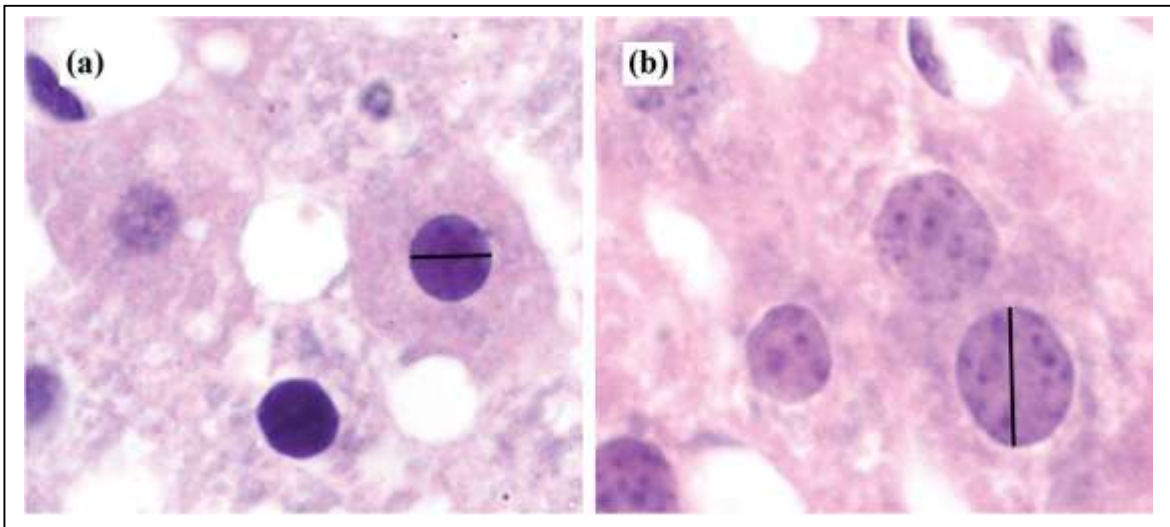


Figura 6. Diferencias en el tamaño de los núcleos. (a) Núcleos de los hepatocitos del grupo control tuvieron un diámetro de $5.7 \mu\text{m}$ (b) Núcleos de los hepatocitos de ratón expuestos a Pb por 8 semanas tuvieron $15 \mu\text{m}$ de diámetro (H&E). Pb: Plomo.

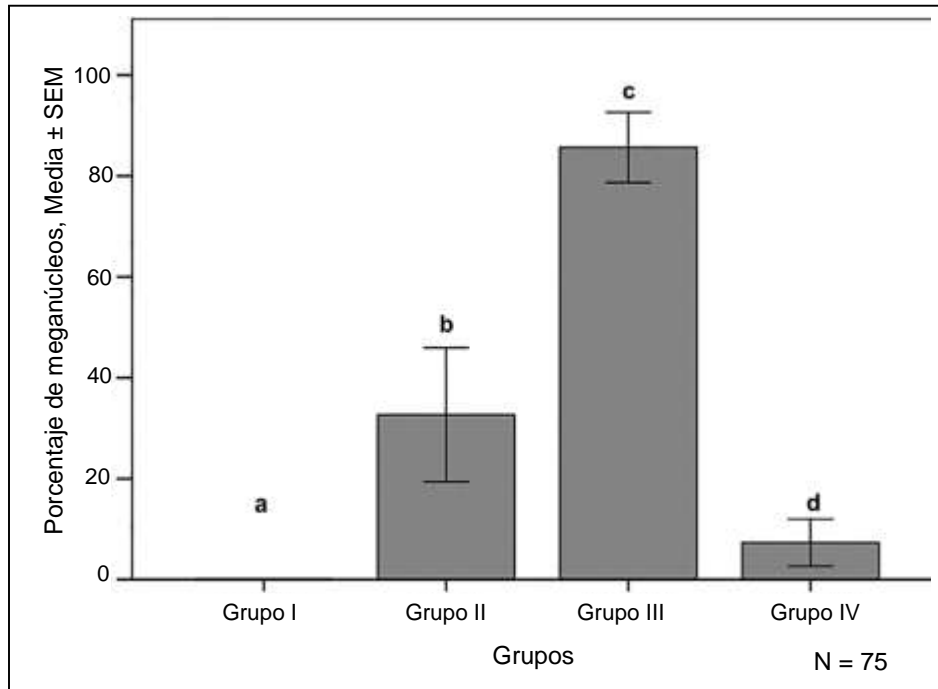


Figura 7. Porcentaje de mega-núcleos determinado en los controles (Grupo I), los ratones expuestos a Pb durante 4 (Grupo II) y 8 semanas (Grupo III) y el grupo en el que se interrumpió la exposición al Pb (Grupo IV). Los resultados se muestran en media \pm Error estándar de la media ($\bar{X} \pm SEM$). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. n = 3

8.3 Evaluación de la función hepática en suero.

Las modificaciones en las PFH se observaron desde las 4 semanas de la exposición al Pb. Las concentraciones de la AST, comparadas con el grupo control se incrementaron a partir de la cuarta semana de exposición. Del mismo modo se observó un incremento en la ALT. Ambas enzimas disminuyeron su concentración en la octava semana, sin embargo los valores se mantuvieron elevados en comparación con grupo control. Después de las cuatro semanas de recuperación no se observan diferencias significativas con el grupo control, para las dos enzimas

(AST y ALT). La deshidrogenasa láctica (LDH) tuvo un comportamiento similar a la AST y ALT, pero a diferencia de estas enzimas, la concentración en sangre de LDH no disminuyó después de la recuperación por 4 semanas (Tabla 3).

El grupo al cual se le administró SAC, no presentó diferencias significativas en comparación con el control para ninguna de las enzimas analizadas en las PFH, durante las cuatro y ocho semanas. La SAC previno el aumento en la concentración de la ALT inducida por Pb (grupo VI). En cuanto a la concentración de AST, lo SAC no previno por completo el incremento en la concentración de la enzima inducido por plomo, ya que el grupo SAC + Pb (VI) presentó diferencias significativas tanto con el grupo control (I) y con el grupo expuesto a plomo (II). El incremento en la concentración de LDH inducido por Pb no se previno con la administración de SAC (grupo VI).

El plomo indujo un incremento en el ratio De Ritis (AST/ALT), desde las 4 y 8 semanas. En los grupos donde se administró SAC y en el grupo donde los ratones fueron expuestos a plomo y se administró el antioxidante, no presentó diferencias significativas con el grupo control, en ninguno de los dos tiempos analizados. El SAC previno alteración en el Ratio de De Ritis inducida por Pb, desde las 4 semanas.

En el grupo en el cual la exposición a Pb fue discontinua, disminuyó el ratio De Ritis, siendo menor a un que el control.

Tabla 4. Evaluación de la función hepática en suero.

Grupo	ALT	AST	LDH	AST/ALT
I	30.3 ± 4.4 ^a	39.6 ± 2.7 ^a	126.3 ± 35.2 ^a	1.32 ± 0.16 ^a
II	102 ± 21.4 ^b	168.3 ± 6.4 ^c	1443 ± 35.2 ^b	3.67 ± 0.46 ^b
III	89 ± 0.6 ^b	72.6 ± 5.9 ^b	1225.6 ± 49.6 ^b	3.21 ± 0.33 ^b
V	35.3 ± 6.9 ^a	24.6 ± 7.3 ^a	123.3 ± 18.1 ^a	0.79 ± 0.34 ^a
VI	25 ± 4.5 ^a	46 ± 9.8 ^a	113 ± 1.2 ^a	1.34 ± 0.48 ^a
VII	37.7 ± 3.6 ^a	82.6 ± 8.2 ^b	1204 ± 119.2 ^b	0.85 ± 0.12 ^a
VIII	23.1 ± 3.1 ^a	75.5 ± 1.4 ^b	1199.5 ± 173.5 ^b	0.89 ± 0.02 ^a
IV	36.5 ± 3.9 ^a	18.4 ± 4.2 ^a	1309.0 ± 106.6 ^b	0.51 ± 0.11 ^c

El grupo control (Grupo I), los ratones expuestos a Pb durante cuatro semanas (Grupo II), los expuestos a Pb durante ocho semanas (Grupo III), los ratones a los que se administró SAC durante 4 semanas (Grupo V), los ratones a los que se administró SAC durante 8 semanas (Grupo VI), los ratones a los que se administró SAC y Pb durante 4 semanas (Grupo VII), a los que se administró SAC y Pb durante 8 semanas (Grupo VIII), los ratones donde se interrumpió la exposición a Pb (Grupo IV). Concentración en sangre (\bar{X} +ES). Las letras diferentes indican diferencias significativas, n = 5. ALT: Alanina aminotransferasa, AST: Aspartato aminotransferasa LDH: Lactato deshidrogenasa, AST/ALT: Radio de *Ritis*, SAC: s-alilcisteína, Pb: plomo [0.1M].

8.4 Determinación de 4-Hidroxinonenal y nitrotirosina por inmunohistoquímica.

Los grupos expuestos a la inhalación de Pb mostraron una mayor presencia de 4-HNE ($p < 0,05$: ANOVA; *Tukey*). La cantidad de marca, por la presencia de 4-HNE, incrementó significativamente a partir de la primera semana, presentándose en la octava semana la mayor concentración de 4-HNE. Sin embargo, en ratones en los que la exposición se suspendió durante cuatro semanas no se observaron diferencias significativas, comparados con los controles (Figura 8 y 9).

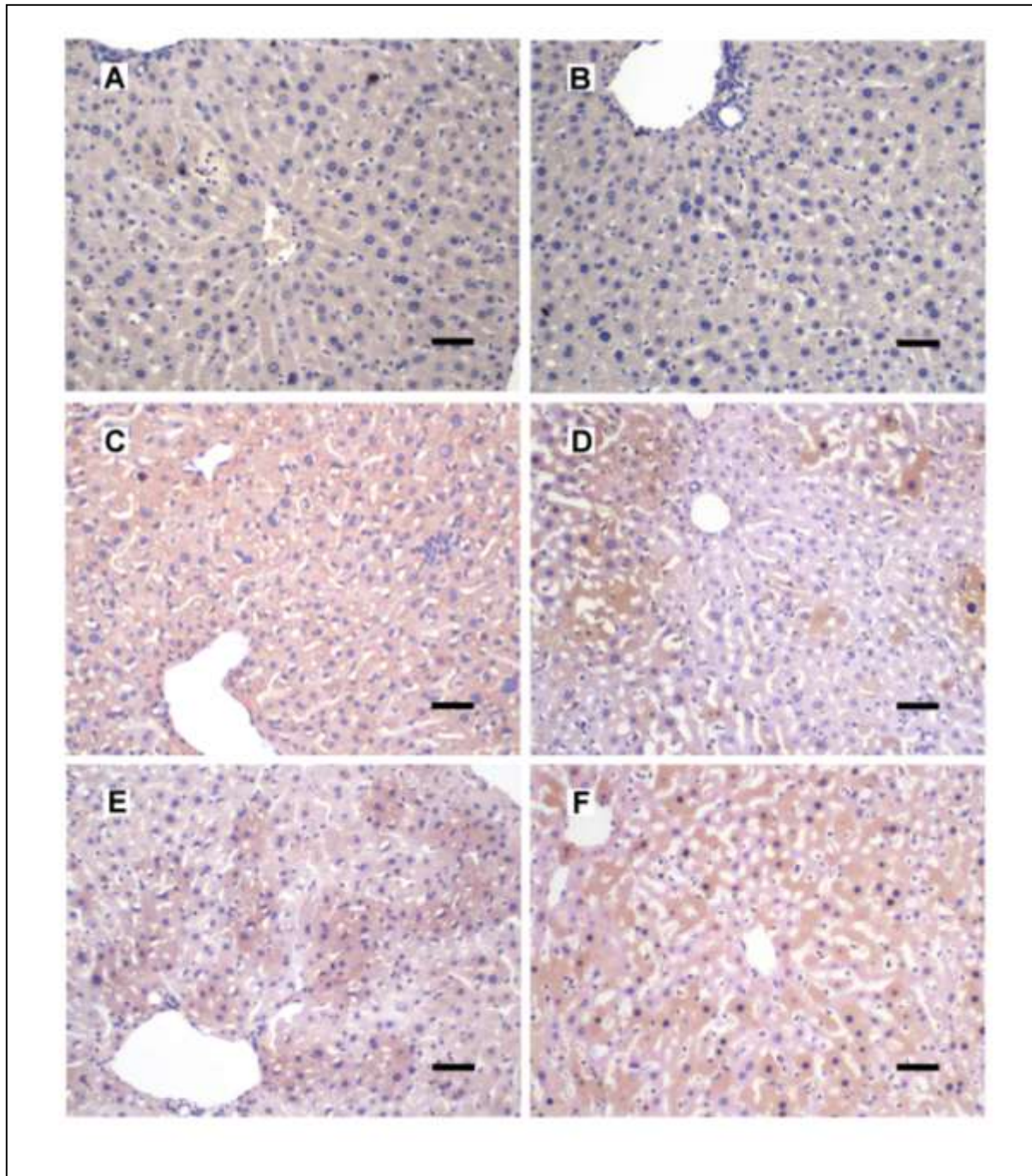


Figura 8. Inmunohistoquímica para 4-HNE y nitrotirosina. (A) y (D) Grupo I Control. No se observa marca para 4-HNE y nitrotirosina. (B) y (E) Grupo II expuesto a Pb por 4 semanas (4-HNE y nitrotirosina, respectivamente). Se observa marca positiva para ambos marcadores. (C) y (F) Grupo III expuesto a Pb por 8 semanas (4-HNE y nitrotirosina, respectivamente). Se observa marca positiva para ambos marcadores. (400X). 4-HNE: 4 hidroxinonenal. Pb: Plomo

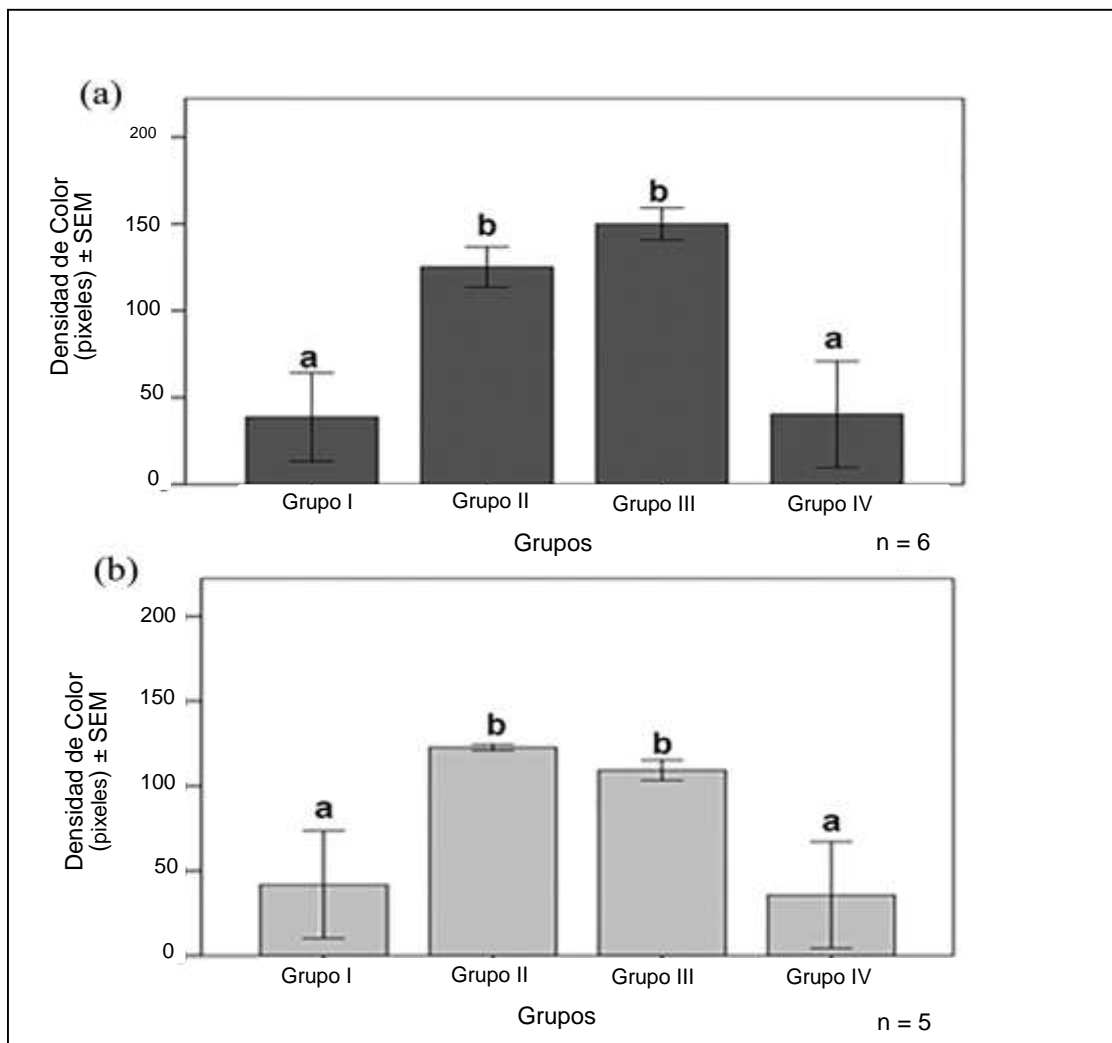


Figura 9. Valores de densidad media para el 4-HNE (a) y la nitrotirosina (b) en hígado de ratón expuesto a plomo [0.1M]. Grupo I es el grupo control, grupo II y III corresponden a los ratones expuestos a Pb por 4 y 8 semanas, respectivamente; el grupo IV incluye a los ratones a los que se les suspendió la exposición a Pb y tuvieron 4 semanas de recuperación. En los grupos expuestos a Pb se observó un incremento en la densidad de color. En el grupo con 4 semanas de recuperación después que se suspendió la exposición a Pb disminuyeron los valores de densidad de color. Los resultados se muestran en media \pm Error estándar de la media ($\bar{X} \pm SEM$). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, n = 5.-HNE: 4-hidroxinonenal, Pb: Plomo.

En los ratones a los que se les administró el antioxidante (SAC; grupo V) y a los que inhalaban Pb (grupo II) y se les administró el antioxidante (SAC+Pb; grupo VI), se evaluó la presencia de estrés oxidante, con la técnica de inmunohistoquímica para 4-HNE a las 4 y a las 8 semanas de exposición. La administración de SAC (grupo VI) previno significativamente el aumento de 4-HNE inducido por Pb en el grupo II y no se observaron diferencias significativas en la densidad media de color en el grupo VI, en comparación con el grupo control (Figura 10 y 11).

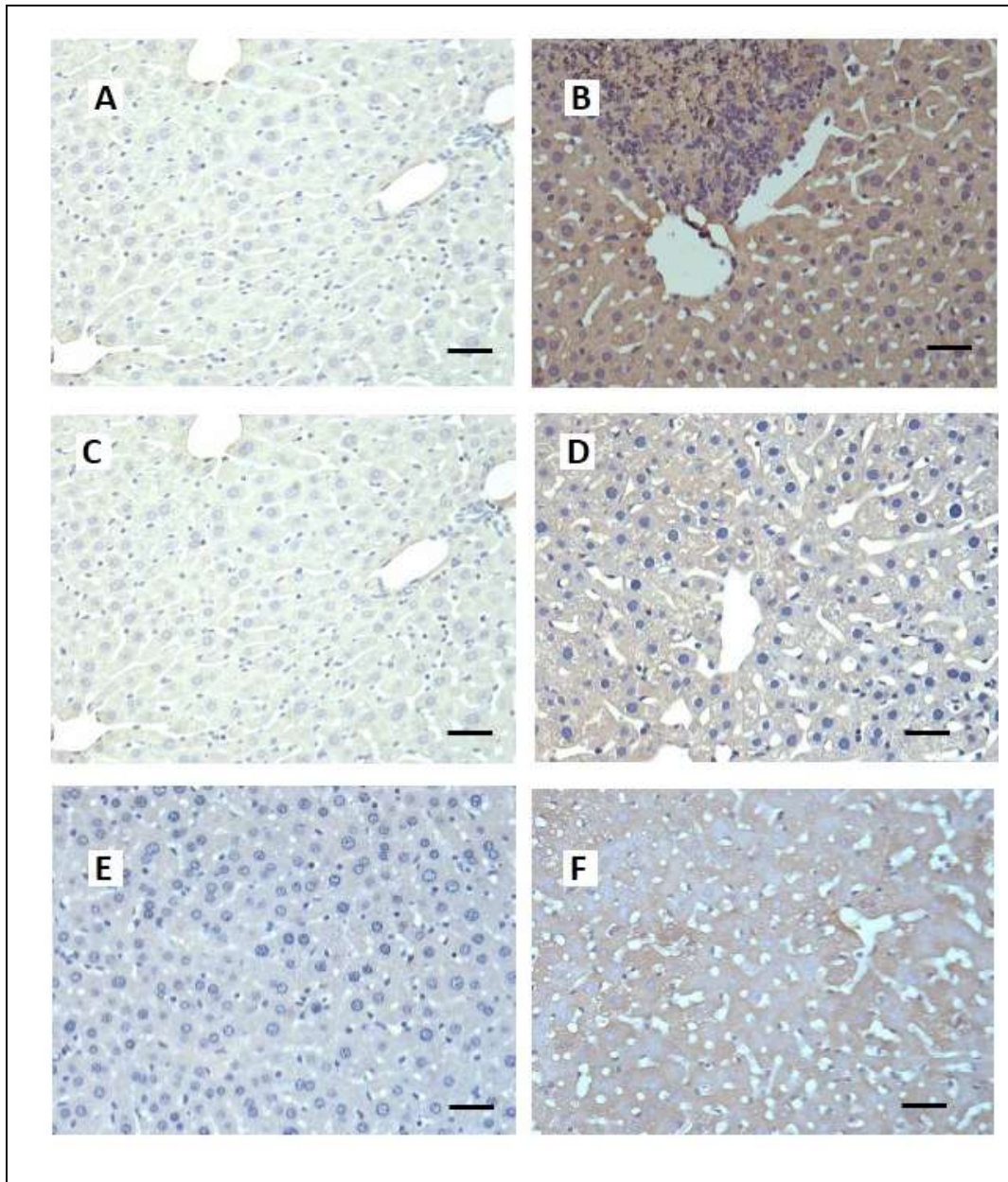


Figura 10. Inmunohistoquímica para 4-HNE. (a) Grupo Control. No se observó marca para 4-HNE. (b) Grupo expuesto a Pb durante 8 semanas. (c) y (d) Grupos expuestos por 4 semanas a SAC y SAC+Pb (Grupo V y VI). (e) y (f) Grupos expuesto por 8 semanas a SAC y SAC+Pb. (400X). 4-HNE: 4- hidroxinonenal, SAC: S-alilcisteína, Pb: Plomo.

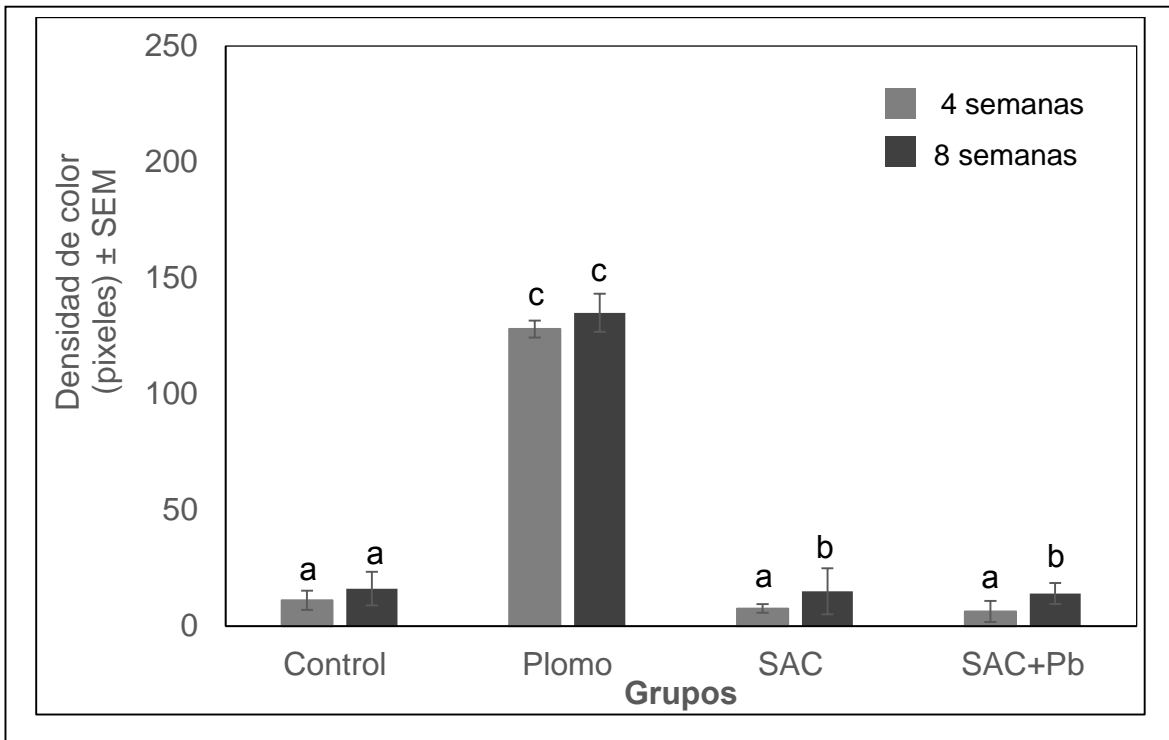


Figura 11. Densidad media para 4-HNE en el grupo control y los expuestos a Pb (Grupo II y III) SAC (Grupo V y VI) y SAC+Pb (Grupo VII y VIII), durante 4 y 8 semanas. Los resultados se muestran en media \pm Error estándar de la media ($\bar{X} \pm SEM$). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos, $n = 5$. No se observaron diferencias entre los grupos con antioxidante y el grupo control.

8.5 Enzimas Antioxidantes Endógenas

Los grupos I, V y VI (Control, SAC y SAC + Pb) durante las 4 y las 8 semanas de exposición no presentaron diferencias significativas en la actividad (UI/mg proteína) de enzimas antioxidantes evaluadas (CAT, GPx, GST, Gr y SOD).

En el grupo expuesto a Pb [0.1M] y el resto de los grupos I, V y VI se observaron diferencias significativas en la actividad de las enzimas CAT, GST, Gr. La actividad de catalasa y glutatión – S – transferasa en el grupo expuesto a Pb [0.1M] fue significativamente mayor que el resto de los grupos. La actividad de glutatión reductasa disminuyó significativamente en el grupo expuesto a Pb [0.1M] en comparación con los grupos I, V y VI (grupos control, SAC y SAC+Pb). La actividad de las enzimas GPx y SOD no presentaron cambios significativos entre los grupos (ver figura 12). La SAC previno el aumento de CAT y GST y la disminución de Gr, inducido por Pb.

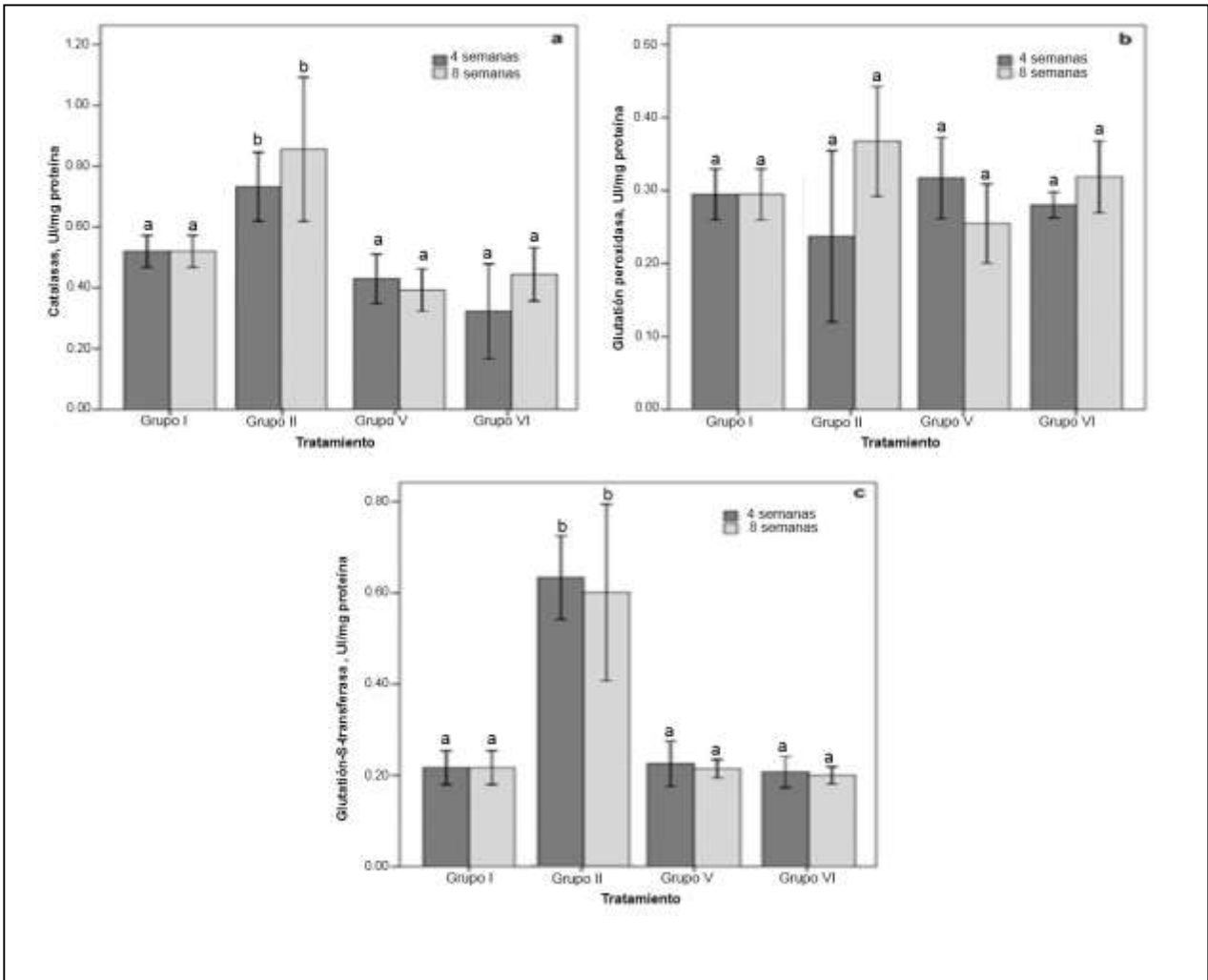


Figura 12. Actividad total de las enzimas antioxidantes (U/mg proteína) (A) en el grupo control (Grupo I), el grupo expuesto a Pb [0.1M] (Grupo II), el grupo al que se le administró el antioxidante (Grupo V), el grupo al que se administró el antioxidante y después se expuso a Pb 0.1 M (Grupo VI) y. a) Catalasas, b) Glutación peroxidasa, c) Glutación – S – transferasa. Los resultados se muestran en media \pm Error estándar de la media ($\bar{X} \pm SEM$). Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos, n=5.

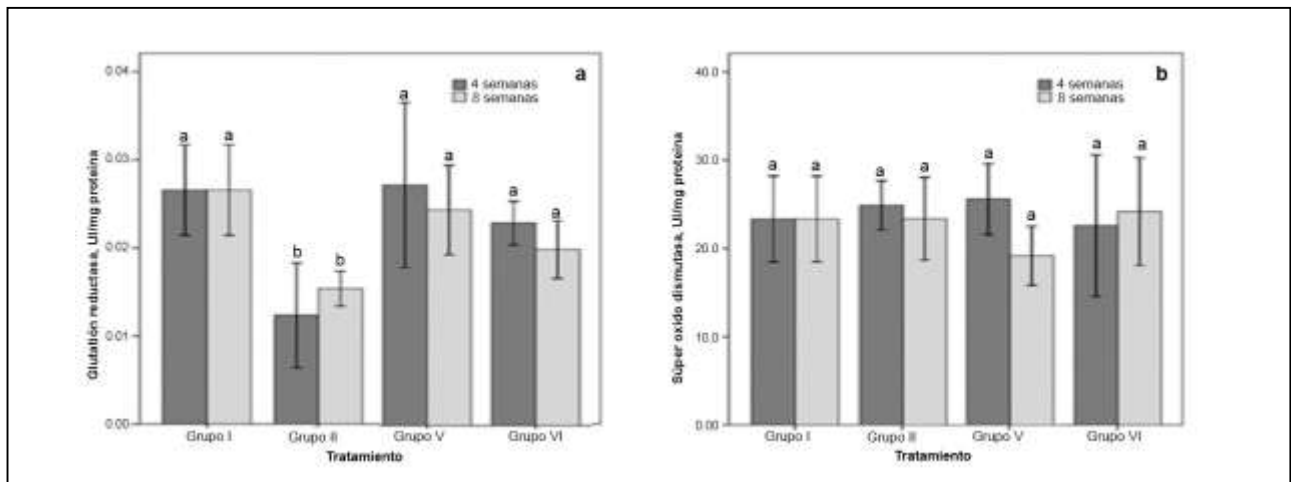


Figura 12. Actividad total de las enzimas antioxidantes (U/mg proteína) (B) en el grupo control (Grupo I), el grupo expuesto a Pb [0.1M] (Grupo II), el grupo al que se le administró el antioxidante (Grupo V), el grupo al que se administró el antioxidante y después se expuso a Pb 0.1 M (Grupo VI) y. a) glutatión reductasa, b) Superóxido dismutasa. Los resultados se muestran en media \pm Error estándar de la media ($\bar{X} \pm$ SEM). Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos, n=5

9. Discusión

El Pb aún en bajas concentraciones puede generar graves alteraciones en sus tejidos blanco y el hígado ha sido considerado uno de ellos (Hodgson y Levi, 2004; Mudipalli 2007). En la ciudad de México, aún se encuentran concentraciones de plomo, a pesar de las medidas tomadas para disminuir la contaminación atmosférica (Menes-González *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2010). Los estudios de los efectos de Pb cuando es incorporado a través de la ingesta son numerosos, sin embargo en nuestra ciudad consideramos que la principal exposición es a través de la inhalación de partículas suspendidas con el metal adosado, por ello la importancia de profundizar en un estudio donde el Pb es incorporado a través de la inhalación. La

SAC es un antioxidante que encontramos en el ajo, un ingrediente de uso común en la comida de los mexicanos y que probablemente ayuda a mitigar los daños generados por el metal. El objetivo de este trabajo es evaluar el daño generado morfofuncional que la inhalación de plomo ocasiona en el hígado, en un modelo experimental y el efecto protector de la SAC.

Para ello se expuso a ratones a la inhalación de Pb y a SAC y a la exposición conjunta de Pb y el antioxidante.

Los resultados indican que el Pb inhalado llegó al hígado e induce cambios histológicos y funcionales que fueron evidentes en la cuarta y octava semana de exposición. El daño disminuyó cuando la exposición se suspendió por 4 semanas. La concentración de Pb en el hígado y la sangre de los ratones expuestos indican que el Pb se absorbe en los pulmones a través de los alvéolos y luego alcanza la circulación sistémica y el hígado a través de las arterias hepáticas. Finalmente, este metal se almacena en hígado, que es el tejido blando donde se suelen acumular las concentraciones más altas de este elemento (Mudipalli, 2007).

Los factores que contribuyen a la susceptibilidad del hígado para generar daño son bien conocidos. Estos factores se relacionan con el transporte de los xenobióticos, ya que pueden ser transportados al hígado por dos vías la vena porta hepática y la arteria hepática. El segundo factor tiene que ver con la capacidad del hígado para metabolizarlos. Gran parte de la biotransformación son reacciones oxidativas, que producen metabolitos reactivos que pueden inducir lesiones hepáticas (Hodgson y Levi, 2004).

Cambios histológicos.

El infiltrado agudo y crónico se identificó alrededor de las tríadas portales y venas centrales, observaciones semejantes a lo reportado por Mani et al. (2007). En otros estudios por intoxicación por Pb se ha observado una disminución significativa en la supervivencia de hepatocitos (Iavicoli et al., 2002) y a un aumento en el número y la gravedad de alteraciones patológicas tales como focos de necrosis celular y apoptosis (Sanchez-Chardi et al., 2009). Estos cambios también se observaron en este estudio. Nuestros hallazgos coinciden con los reportados por Damek y cols. (2004) quién observó polimorfismos nucleares, vacuolización celular, regeneración de hepatocitos así como fibrosis intersticial en los roedores afectados.

El aumento de hepatocitos con mega-núcleos es conocido como megalocitosis, se ha asociado con la inhibición de la mitosis de hepatocitos y la presencia de fibrosis cerca de la vena central y los conductos biliares (Svoboda et al., 1971). La Inhibición de la mitosis se ha asociado con sustancias hepatotóxicas como el tetracloruro de carbono y lasiocarpina (Jago, 1969). Este cambio puede interpretarse como un aumento de la poliploidía nuclear. Sin embargo, la transcripción y los procesos de traducción (es decir, síntesis de ARN y actividad de la RNA polimerasa) permanecen intactos en los megalocitos hepáticos; por lo tanto, estas células son morfológica y funcionalmente viables, excepto cuando están en un proceso hipertrófico y no pueden dividirse (Dowing y Peterson, 1968; Svoboda et al., 1971). Los cambios nucleares encontrados en este estudio también muestran la capacidad regenerativa del hígado y lo cual fue previamente informado en un estudio de exposición subcrónica al vanadio por inhalación en el hígado (Cano-Gutiérrez et al., 2012). La

megalocitosis ocurre cuando los hepatocitos se estimulan para dividirse después de un estímulo regenerativo y la mitosis se inhiben pero la síntesis de ADN no (Danadevi et al., 2003). Jarrar y Taib (2012) informaron que después de administrar (*p.o.*) una dosis de Pb a ratas, se produjeron cambios nucleares menores en comparación con los informado en este estudio. Esto sugiere que la inhalación a Pb produce un mayor daño hepático, como se muestra en el presente estudio.

Los ratones expuestos a Pb presentaron esteatosis, lo cual indica lesión reversible en órganos y podría ser la consecuencia de un daño directo a las membranas celulares, la mitocondria o el retículo endoplásmico rugoso (REr). El daño mitocondrial puede interferir con la β -oxidación de triglicéridos y su acumulación en el citoplasma. Además, el daño al REr podría resultar en la disminución en la síntesis de proteínas de transporte de lípidos y una disminución en la síntesis de las enzimas encargadas de la β -oxidación y su acumulación en el citoplasma (Haschek et al., 2010). Estas alteraciones han sido descritas después de la exposición a otros tóxicos (tetracloruro de carbono, níquel (Hodgson y Levi, 2004; Varg et al., 2005) y con menor daño al administrar Pb por vía oral (Jarrar y Taib, 2012).

La SAC se conoce por ser un antioxidante capaz de capturar radicales libres. Además, la SAC inhibe el depósito de colágena y la expresión de desmina, actina de musculo liso (α -SMA) y la citocina profibrogénica TGF- β (Galicia *et al.*, 2009). Por tanto, el resultado reversible de SAC ante el daño por la exposición a plomo, en nuestro estudio, se debe a un doble efecto de SAC. Resultado que también se

encontró en ratas con fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (Kodai *et al.*, 2015).

Cambios bioquímicos.

Alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático.

Niveles elevados de ALT y AST se asocian con esteatosis hepática y necrosis. De las dos transaminasas (ALT y AST), ALT se considera más específica para daño hepático porque está presente principalmente en el citosol de los hepatocitos y se encuentra en bajas concentraciones en otros órganos. AST tiene formas citosólicas y mitocondriales y está presente en el hígado, corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas y pulmones. El aumento de la actividad de la enzima puede explicarse por la presencia de lesiones hepatobiliares debido al daño del tejido. A fin de metabolizar estos aminoácidos, el proceso de la transmutación se incrementa. Esto lleva a un aumento de la actividad AST y ALT (Garg *et al.*, 2007). LDH es un marcador menos específico para necrosis hepatocelular, por lo que el aumento en los niveles de LDH en grupo donde se suspendió la exposición por 4 semanas podría indicar daño en otros tejidos (Pratt y Kaplan, 2000). El radio de De Ritis, en un inicio fue empleado para diagnosticar la hepatitis viral aguda donde la ALT era superior a la AST, posteriormente lo utilizaron en la hepatitis alcohólica, donde AST suele ser mayor. En nuestro estudio sugiere daño hepático severo en la cuarta y octava semana de exposición, semejante a lo encontrado en hepatitis

aguda fulminante y en donde existe una progresión de fibrosis a cirrosis, en hepatitis alcohólica (Sorbi et al., 1999; Brotos y Sikaris, 2013).

La SAC disminuye los niveles de ALT en ratas que presentaban hiperlipidemia y fibrosis hepática (Asdaq 2015; Kodai *et al.*, 2015). Así mismo, ante el daño generado por la inhalación de plomo los ratones, SAC actuó revirtiendo el daño provocado por el metal. Sin embargo, en las otras enzimas de función hepática (AST y LDH) no presentaron diferencias significativas en los ratones expuestos a plomo y los ratones a los que se les administró SAC y los expuestos a plomo. Por lo que otros tejidos pueden seguir presentando daño por el plomo, a pesar de la presencia del antioxidante.

Alteraciones en las enzimas antioxidantes.

El plomo agota el GSH, y como consecuencia inhibe el sistema que se encarga de remover el H_2O_2 (GPx/Grd), resultando en un incremento en H_2O_2 (Dunderski, 2004; Valko *et al.*, 2007). La Gr, actúa sobre el GSH por la GPx para la reducción del H_2O_2 y lipoperóxidos. Si la actividad de la Grd disminuye, da como resultado disminución en el GSH disponible e incrementa la cantidad de radicales libres.

La enzima GST es capaz de unir GSH a los compuestos tóxicos generados durante la oxidación de membranas (4-HNE), al unirse al GSH el compuesto tóxico pierde la capacidad de unirse a macromoléculas y provocar daño celular (Hubatsch *et al.*, 1998). El incremento en la actividad de GST, en los ratones expuestos a plomo, es consecuencia de la activación de mecanismos compensatorios ante la presencia de

un agente tóxico. La enzima catalasa, al igual que el sistema (GPx/Grd) remueve el peróxido de hidrógeno, pero esta enzima se localiza en peroxisomas y mitocondrias.

Las catalasas catalizan la detoxificación de H_2O_2 , mediante el rompimiento del H_2O_2 en agua y oxígeno. El aumento en la actividad de las catalasas se da en respuesta al incremento en los iones peróxido de oxígeno, para poder evitar el daño celular (Valdivia, 2005; Adegbeson y Adenuga, 2007). Este incremento en la actividad de las catalasas, lo encontramos en los ratones expuestos a plomo, cambio que se reporta también en el cerebro de ratón cuando administraron por *IP*, subaguda (7 días) acetato de plomo (Correa et al., 2008).

Desde 1988 Sparnins y cols. demostraron que los compuestos orgánicos de azufre (como la SAC) modulan la actividad de la GST en el estómago, la mucosa del intestino delgado, el hígado y el pulmón (Rivas 2016). La adición de polvo de ajo en la dieta de ratas incrementa la actividad de la GST y del di-nucleótido de nicotinamida adenina fosfato (NADPH) en glándula mamaria y en hígado (Rabinkov et al., 1998). La SAC protege a las células endoteliales de lesiones generadas por peróxido de hidrogeno y también a los hepatocitos ante la toxicidad por tetracloruro de carbono (Sundaresan y Subramanian, 2003).

Los ratones que se expusieron de manera conjunta al plomo y al antioxidante (SAC) no presentaron alteraciones en las enzimas antioxidantes. Por lo tanto los ratones fueron capaces de recuperarse de los efectos oxidativos del plomo, gracias a la capacidad de la SAC de capturar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por

medio de sus grupos sulfhidrilo. Además, la SAC estimula la síntesis de GSH, sustrato empleado por la enzima GPx, esta enzima se encarga de reducir el H₂O₂ en agua. La SAC puede también actuar como un homólogo del GSH (Macan *et al.*, 2006; Kodai *et al.*, 2007; Herrera – Mundo *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010).

Evaluación del estrés oxidante –lipoperoxidación y nitración- por inmunohistoquímica.

El aumento en la nitrotirosina y el 4-HNE durante la exposición sugiere que la llegada directa del Pb al hígado por los pulmones produce radicales libres y estrés oxidante en el hígado. Estos radicales libres y las ROS tienen capacidad de oxidar lípidos y proteínas, lo cual se observó con el incremento de las concentraciones de 4-HNE y nitrotirosina (Fortoul *et al.*, 2005, 2010). La peroxidación lipídica afecta principalmente a estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Este proceso lleva a la degradación lipídica y los resultados son una variedad de compuestos citotóxicos, tales como los aldehídos 4-HNE. En las mitocondrias, este proceso puede conducir a la célula directamente a la necrosis o apoptosis (Ott *et al.*, 2007).

Además, el NO^{*} y sus metabolitos interactúan con las ROS para generar nitración de proteínas que conllevan a la formación de nitrotirosina, uno de los cambios que ocurren durante el estrés oxidante/nitrosante (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006). Las proteínas pueden modificarse por oxidación, como la formación irreversible de di-tirosina y su carbonilación en residuos de arginina y lisina. En tales casos, las proteínas pueden ser degradadas (Ott *et al.*, 2007). El Pb indujo estrés oxidativo al

alterar la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos y los efectos del desbalance lo observamos en el incremento en la marca para 4-HNE y nitrotirosina.

El grupo de ratones donde se administró el antioxidante y se expuso a Pb no presentó cambios histológicos ni bioquímicos (enzimas antioxidantes e inmunohistoquímica para 4HNE), por lo tanto la SAC actuó como un antioxidante capaz de inhibir los efectos tóxicos del plomo, así como los productos generados por la peroxidación lipídica (4-HNE) dados por el desbalance oxido-reductor provocado por el Pb.

Finalmente, los hallazgos en el grupo donde la exposición se suspendió sugieren que las alteraciones bioquímicas e histológicas observadas son reversibles. Esto se refuerza con el radio de *De Ritis* que nos indicó que no hay daño en el tejido hepático.

10. En conclusión

En el primer estudio que evalúa el daño hepático por inhalación de Pb, se observó el ingreso del plomo al hígado por vía inhalada. Lo cual indujo cambios hepáticos morfológicos y funcionales en el tejido hepático. Se observó un aumento de las concentraciones de Pb en la sangre y el hígado durante la exposición a Pb, que disminuyó cuando se suspendió la exposición, sugiriendo que el hígado eliminó

eficientemente el metal. El principal mecanismo de toxicidad para algunos metales es la generación de estrés oxidante/nitrosante que se hizo evidente en este estudio, con un incremento en 4-HNE y nitrotirosina durante la exposición. Existen informes limitados sobre el daño hepático después de la inhalación de Pb, especialmente en relación con partículas suspendidas en ciudades con contaminación atmosférica (Skerfving et al., 2007). En este caso, el Pb podría inducir consecuencias funcionales más graves y en menor tiempo, en comparación con la administración por vía oral, que es la ruta de intoxicación más explorada.

Los mecanismos antioxidantes del SAC son conocidos y su administración permitió una recuperación histológica y funcional del tejido hepático, lo que nos permite proponer a este agente como potencial tratamiento en las intoxicaciones por plomo.

11. Literatura citada.

Adachi K y Buseck PR. 2010. Hosted and free-floating metal-bearing atmospheric nanoparticles in Mexico city. *Environ Sci Technol.* 44: 2299 – 2304.

Adegbesan BO y Adenuga GA. 2005. Effect of lead exposure on liver lipid peroxidative and antioxidant defense systems of protein – undernourished rats. *Biol Trace Element Res.* 116: 220 – 225.

Aebi HE. 1974. “Methods in Enzymatic Analysis,” ed. by Bergmeyer H. U. pp. 673—678.

Agarwal S, Roy S, Atish R, Mazumder S, Bhattacharya Sh. 2009. Arsenic trioxide and lead acetate induce apoptosis in adult rat hepatic stem cells. *Cell Biol Toxicol.* 25: 403 – 413.

Asdaq SMB. 2015. Antioxidant and hypolipidemic potential of aged garlic extract and its constituent, s-allyl cysteine, in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 1: 1 – 7.

Ballatori N. 2002. Transpot of toxic metals by molecular mimicry. *Environment. Health Perspect.* 110(5):689-694.

Batraa N, Nehrua B, Bansal MP. 2007. The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. *Reproduc Toxicol.* 12 (5):535-540.

Berrahal AA, Nehdi A, Hajjaji N. 2007. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *C R Biologies.* 330: 581 – 588.

Brotos M y Sikaris K. 2013. The De Ritis Ratio: The test of time. *Cim Biochem Rev.* 34:117 -130.

- Cano-Gutierrez G, Acevedo-Nava S, Santamaria A, et al.** 2012 Hepatic megalocytosis due to vanadium inhalation: participation of oxidative stress. *Toxicology and Industrial Health* 28(4): 353-60.
- Correa M, Pascual M, Sanchis-Segu C, et al.** 2005. Lead – induced catalase activity differentially modulates behaviors induced by short-chain alcohols. *Pharmacol Biochem and Behavior*. 82 (3): 443 – 452.
- Corzo-Martinez M, Corz N, Villamiel M.** 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Sci & Technol*. 18 (12): 609-625.
- Daggettab AD, Oberley TD, Nelson SA, et al.** 1998. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology*.128 (3): 191 – 206.
- Damek-Poprawaa M y Sawicka-Kapustab K.** 2004. Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environmental Research* 76(1): 72 -78.
- Danadevi K, Rozati R, Banu B, et al.** 2003 DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology* 187; 183-193.
- Davies KJA.** 1995 Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61: 1 – 31.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al.** 2002. Free radical – induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol. Med.* 32: 1102 – 1115.
- Dowing D y Peterson J.** 1968. Quantitative assessment of the persistent antimitotic effect of certain hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids on rat liver. *Australian journal of Experimental biology and medical science* 46: 493-502.

- Drögue W.** 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82: 48 -5.
- Dunderski J.** 2004. Cellular stress response – defense against metal toxicity. *Yugos Medic Biochem.* 23: 1 - 9.
- Ennulat D, Magid-Slav M, Rehm S, et al.** 2010. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rats. *Toxicol. Sciences.* 116(2): 397 – 412.
- Flora SJ, Flora G, Saxena G, et al.** 2007. Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation. *Cell Mol Biol.* 53(1): 26 47.
- Flora SJ, Mittal M, Mehta A.** 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* 2008:128(4):501-523.
- Floriano- Sánchez, Cleve V, Medina CO, et al.** (2006) Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radical Research.* 40 (5): 523 -533
- Fortoul T I, Saldivar L, Tovar TA, et al.** 1996. Metals in lung tissue from autopsy cases in México City residents. Comparison between cases from 1950s and he 1980s. *Environ Health Perspect.* 104: 630 – 632.
- Fortoul TI, Salgado CR, Moncada SG, et al.** 1999. Ultrastructural findings in the murine nonciliated bronchiolar cells (NCBC) after subacute inhalation of lead acetate.
- Fortoul T I, Saldivar L, Espejel-Maya G, et al.** 2005. Inhalation of cadmium, lead or its mixture effects on the bronchiolar structure and its relation with metal tissue concentrations. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* 19: 329 – 334.

- Galicia-Moreno M, Rodríguez-Rivera A, Reyes Gordillo K, et al.** 2009. N - acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. *Eur J Gastroen Hepat.* 21: 908 – 914.
- García R, Belmont R, Padilla H, et al.** 2009. Trace metals and inorganic measurements in rain from Mexico city and nearby rural area. 25 (2): 71 -86.
- Garg ML, Badhu HK, Kumar A, Dhawan DK.** 2007. Lead induced alterations in protein-deficient rat liver-role of zinc. *Toxicol and Environ Chem.* 89: 523 -533.
- Gartner LP y Hiatt LJ.** 2008. Sistema digestivo: glándulas. pp. 413 – 436. In Garter (eds) 3^{era}edic. Texto Atlas de histología. Edit. Mc Graw Hill. EUA. 574 pp.
- Garza CA.** 2004. *Efecto el plomo sobre la transmisión sináptica y la actividad aferente en el sistema vestibular.* (Tesis de licenciatura en biomedicina) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México
- Geneser F.** 2008. Aparato digestivo. Estructura general del tracto digestivo. pp. 465-580. In Geneser (eds). 3^{era}edic. Histología. edit. Panamericana. Argentina. 813 pp.
- Geng Z, Rong Y, Lau BH.** 1997. S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 345–350.
- Giboney PT.** 2005. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Amer Family Phys.* 71(6): 1105 – 1110.
- Godwing AH.** 2001. The biological chemistry of lead. *Bio-inorganic chemistry.* 5(2) 223 - 227
- Gurer H y Ercal N.** 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med.* 29(10):927-945.

Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgunes H. 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicol.* 195(2-3):147-154.

Halliwell B y Guttridge JMC 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd edic. Clarendon Press, Oxford, UK.

Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. 2010. The liver In: Fundamentals of Toxicologic Pathology (Second Edition). Canada Elsevier Inc, pp 197- 236. Hodgson E and Levi P (2004): Hepatotoxicity In: E. Hodgson (eds) A Textbook of modern toxicology 3thedic. USA: John Wiley & Sons Inc, pp.262 – 273.

He Y, Mengmeng L, Narek D et al. 2014. pH- Dependent coordination of Pb²⁺ to metallothionein2: Structures and insight into lead detoxification. *Inorganic Chem.* 53: 2822-2830.

Hatono Sh. Jimenez A, Wargovich. 1996. Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis.* 5: 1041-1044.

Herrera-Mundo N, Silva-Adaya D, Maldonado PD et al., 2006. S-Allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neuroscience Research.* 56 (1): 39-44.

Hodgson E y Levi PE. 2004. Hepatotoxicity pp. 262 – 273. In: E. Hodgson (eds). A Textbook of modern toxicology. 3thedic. ed. John Wiley & Sons, Inc.

Hubatsch I, Ridderström M, Mannervik B. 1998. Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4 – hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem. J.* 330: 175 – 179.

- Iavicoli I, Carelli G, Stanek III EJ, et al.** 2002. Effects of *per os* lead acetate administration on mouse hepatocyte survival. *Toxicol Letters*. 129: 143 – 149.
- Imai J, Ide N, Nagae S, et al.,** 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Plant Med*. 60(5):417-20.
- Jago M.** 1969. The development of the hepatic megalocytosis of chronic pyrrolizidine alkaloid poisoning. *American Journal Pathology* 56: 405-421.
- Jarrar BM y Taib NT** (2012) Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19; 203-210.
- Jomova K y Valko M.** 2011. Advances in metal – induced oxidative stress and human disease. *Toxicol*. 283: 65 -87.
- King MW.** 2017. Introduction of aminoacids metabolism. *In: the medical biochemistry page*. org. LLC
- Kim K M, Chun SB, Koo M, Choi WJ.** 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med*. 30(7):747-56.
- Kirszenbaum AL y Tres LL.** 2012. Glándulas Digestivas. pp. 503 -530. *In: Histología y Biología Celular. Introducción a la anatomía patológica. 3^{era} ed. Histology and Cell Biology: Elsevier Saunders. España. 700 pp.*
- Kharoubi O, Slimani M, Aoues A, et al.** 2008. Prophylactic effects of Wormwood on lipid peroxidation in an animal model of lead intoxication. *Indian J Nephrol*. 18(2):51-57.

- Kodai Sh, Takemura S, Kubo Sh et al.** 2015. Therapeutic administration of an ingredient of aged-garlic extracts, S-allyl cysteine resolves liver fibrosis established by carbon tetrachloride in rats. *J. Clin Biochem Nutri.* 56(3):179-185.
- Kodera Y, Suzuki A, Imada O, et al.,** 2002. Physical, Chemical, and Biological Properties of S-Allylcysteine, an Amino Acid Derived from Garlic. *J. Agric. Food Chem.* 50 (3), pp 622–632.
- Liochev SI y Fridovich I.** 2002. The Haber-Weiss cycle-70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* 7: 55 – 57.
- Llorenc CR, Montserrat PT, Llorens MA, et al.** 2008. Esteatosis hepática no
- Macan H, Uykipang R, Alconcel M, et al.** 2006. Aged garlic extract may be safe for patients on warfarin therapy. *J Nutr.* 136 (3):793-795.
- Maldonado O, Barrera D, Medina-Campos ON, et al.,** 2003. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci.* 73:2543-2556.
- Mani U, Prasad AK, Suresh Kumar V, et al.** 2007 Effect of fly ash inhalation on biochemical and histomorphological changes in rat liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 126-133.
- Martinalde JL y Holbrook NJ.** 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 192: 1 -15.
- Martinez SA, Cancela LM, Virgolini MB,** 2011. Oxidative stress as a mechanism of action of lead. Therapeutic implications. *Acta Toxicol Argent.* 12(2):61-79.

- Meneses- González F, Richardson V, Lino-González M, et al.** 2003. Niveles de plomo en sangre y factores de exposición en niños del estado de Morelos, México. *Salud Pública*. 45: 203 -208.
- Merrill CJ, Morton PJJ, Soileau DS.** 2001. Metals. pp. 649-698. *In: Wallace Hayes A. (Ed.). Principles and Methods of Toxicology.* Taylor & Francis. Philadelphia, USA. 1887 pp.
- Milosevic N y Maier.** 2000. Lead intercellular signaling between hepatocytes and Kupffer cells. *Eur J Pharmacol.* 401: 317 – 328.
- Montalvo AC** 2008. Una mirada al sistema digestivo. 275 -301 pp. *In: Fortoul T. y M. Varela (eds). Una Mirada al mundo microscópico.* edit. Prentice Hall. 401 pp.
- Moshtaghie A, Ani M, Aghadavod E, Fazilati M,** 2007. Protective effects of selenium and zinc on changes in catecholamine levels of brain regions in lead intoxicated rat. *Pak J Biol Sci.* 10(17):2964-7.
- Mouchet F, Baudrimont M, González P, et al.** 2006. Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic Toxicol.* 78: 157 – 166.
- Mudipalli A.** 2007. Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J Med Res.* 126: 518 -527.
- Nelson D y Cox M.** 2009. Fosforilación oxidativa y fosforilación. 732 – 745 pp. *In Lehninger Principios de Bioquímica.* 5ª edic. 1220 pp.
- Noguchi N y Nikki E.** 1999. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. *In: Papas A M. Antioxidants status, diet, nutrition and health.* New York: CRC Press
- NORMA Oficial Mexicana NOM-026-SSA1-1993,** Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al plomo (Pb), Valor normado para la concentración

de plomo (Pb) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN el 23 de diciembre de 1994.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN el 22 de agosto de 2001.

Numagami Y y Ohnishi ST. 2001. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr.* 131(3): 1100 - 1105

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, et al. 2007. Mitochondria oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12: 913–922.

Osman K, Schütz A, Åkesson B, et al. 1998. Interactions between essential and toxic elements in lead exposed children in Katowice, Poland. *Clinical Biochem.* 31 (8): 657-665.

Pande M, Mehta A, Pant BP, et al. 2001. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 9(4):173-184.

Peña Marín V. 2011. *Método de evaluación de dosis por ingestión de polonio, bismuto y plomo como materiales radiactivos naturales.* (Tesis para optar al título de Magister en Ciencias – Física). Fac. de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, et al. 2004. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int.* 45(8):1175-83.

- Pedraza-Chaverrí J, Granados-Silvestre MD, Medina-Campos ON, et al.** 1999. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med.* 27:245-253.
- Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, et al.** 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med.* 29:602-611.
- Pinto JT, Qiao C, Xing J, et al.** 1997. Effects of garlic thioallyl derivatives on growth, glutathione concentration, and polyamine formation of human prostate carcinoma cells in culture. *Am J Clin Nutr.* 66(2):398-405.
- Poma AP.** 2008. Intoxicación por plomo en humanos. *Ann Fac med.* 69(2): 120 -126.
- Pratt DS y Kaplan MM.** 2000. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *The New England Journal Medicine* 342: 1266-71.
- Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L et al.** 1998. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta.* 379 (2): 233-44.
- Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD.** 1976. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest.* 58:260-70
- Rai A, Shailendra M Kr, Priyanka K, et al.** 2010. Characterization of Developmental Neurotoxicity of As, Cd, and Pb mixture. Synergistic action of metal mixture in glial and neuronal functions. *Toxicological Sciences.* 1118(2): 586 – 601.
- Rainbow P S.** 1985. The biology of heavy metals in the sea. *Int. J. Environ. Stud.* 25:195 - 211.

- Rivas L V.** 2016. *Allium Sativum* como fuente potencial de moléculas anticancerígenas. Trabajo fin de grado. Facultad de farmacia. Universidad Complutense. Madrid España.
- Rief P, Pichler M, Raggam R, et al.,** 2016. The AST/ALT (De-Ritis) ratio A novel marker for critical limb ischemia in peripheral arterial occlusive disease patients. *Medicine.* 95(24):1-4.
- Sánchez-Chardi A, Oliveira Ribeiro C A, Nadal J.** 2009. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere* (76): 387 – 394.
- Schutz A, Skerfving J, Ranstam J et al.** 1987. Kinetics of lead in blood after the end of occupational exposure. *Scand J work Environ Health.* 13:221.
- Sieg DJ y Billings RE.**1997. Lead/Cytokine-Mediated oxidative DNA Damage in cultured mouse hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 199: 100 -107.
- Sies H.** 1997 Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology.* 82 : 291 – 295.
- Skerfving S y Bergdahl IA.** 2007. Lead In: Gunnar E. Nordberg, Bruce A Fowler, Monica Nordberg and Lars Friberg. (eds) Handbook on the toxicology of metals 3rd edic. London: Elsevier. pp. 599-643.
- Soboll S, Grundel S, Harris J, et al.** 1995. The content of glutathione and glutathione S-transferases and the glutathione peroxidase activity in rat liver nuclei determined by a non-aqueous technique of liver cell fractionation. *Biochemical Journal* 311, 889-894.
- Sorbi D, Boynyon J, Lindor KD.** 1999. The Ratio of Aspartate Aminotransferase to Alanine Aminotransferase: Potential Value in Differentiating Nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *The Amer J of Gastroenter.* 94 (4): 1118 – 1022.

- Sparnins VL, Baranay G, Wattenberg LW.** 1988. Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo [a]pyrene – induced neoplasia and glutathione S - transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis*. 9(11): 131 – 134.
- Stohs S J y Bagchi KD.** 1995. Oxidative Mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Rad Biol and Medic*. 18(2): 321 – 336.
- Sundaresan S y Subramanian P.** 2003. S-allylcystein inhibits circulatory lipid peroxidation and promotes antioxidants in N-nitrosodiethylamine-induced carcinogenesis. *Pol J of Pharmacol*. 55: 37- 42.
- Sundari P N, Wilfred G, Ramakrishna B.** 1997. Does oxidative protein damage plays a role in the pathogenesis of carbon tetrachloride-induced liver injury in rat? *Biochem Biophys Acta*. 136: 169 – 176.
- Sun X, Xie Y, Wu L, et al.,** 2012. Lead acetate reduces the ability of human umbilical cord mesenchymal stem cells to support hematopoiesis in vitro. *Mol Med Reports*. 6:827 – 832.
- Svoboda D, Reddy J, Bunyaratvej S.** 1971. Hepatic megalocytosis in chronic lasiocarpine poisoning. *American Journal of Pathology* 65(2): 399-409.
- Tsalev DL y Zapriano ZK,** 1985. Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health. Vol I. *In: Analytical aspects and health significance Practice*. CRC Press, Inc. pp 243-244
- Valdivia I M.** 2005. Lead poisoning. *Rev Soc Per Med Inter*. 18(1): 22 - 27
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al.** 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 44 – 84.

Velázquez PM, Prieto GB, Contreras PR. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias.* 75: 36 - 43

Verma S, Yadav S, Singh I. 2010. Trace metal concentration in different Indian tobacco products and related health implications. *Food Chem Toxicol.* 48: 2291 – 2297.

Velázquez PM, Prieto GB, Contreras PR. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias.* 75: 36 - 43

Zhang R, Niu Y, Li Y, et al. 2009. Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice. *Environ Toxicol Chem.* 30: 52 -60.

Zhao M, Wang Y, Huo C, et al., 2010. Lead detoxification activity and ADMET hepatotoxicity of *N*-(α -L-Arabino-furanos-1-yl)-L-cysteine. *Chem Res Toxicol.*23: 1282 - 1285.

Zar H. 1984. Biostatistical Analysis. 2da. Edición. Prentice Hall. USA. 929 pp.

12. Apéndice.

12.1 Artículo Requisito

Check for updates

ARTICLE

Toxicology and
Industrial Health

Lead inhalation and hepatic damage: Morphological and functional evaluation in mice

Toxicology and Industrial Health
2018, Vol. 34(2) 128–138
© The Author(s) 2018
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0748233717730981
journals.sagepub.com/hi/ta/34



Elena S González Rendón¹, Gumaro Gutierrez Cano¹, M Alcaraz-Zubeldia²,
Tania Garibay-Huarte³ and Teresa I Fortoul¹

Abstract

Lead (Pb) is a heavy metal that plays an unknown biological role and is very toxic even at low concentrations. The main sources of Pb are Pb-contaminated areas in industrial areas or landfills. Inhalation is one of the most common routes of exposure to this metal, but there is little information on its effect on the liver. Thirty male mice were exposed to 0.1 M Pb acetate by inhalation for 8 weeks, twice a week for 1 h. A recovery group was free of exposure for 4 weeks. Histological evaluation showed an increase in the inflammatory infiltrate and in the percentage of meganuclei in the liver. This was observed since the first week and throughout the whole exposure time. A significant increase in the aspartate aminotransferase concentration was observed in the liver function tests; yet, the alanine aminotransferase concentration did not show significant changes. The 4-hydroxynonenal (4-HNE) and nitrotyrosine levels in Pb-exposed mice, identified by immunohistochemistry, showed a significant increment compared to the controls. This effect was observed throughout Pb exposure. After a 4-week period of suspended exposure, recovery time, the concentration of 4-HNE and nitrotyrosine decreased to similar levels of those previously observed in controls, this suggests a decrease in the generation of oxidative stress by Pb inhalation. Although our results suggest that the lungs are the first contact organs and filters during Pb inhalation, this metal eventually reaches the liver and might cause damage by oxidative stress. This damage can decrease in time if exposure is discontinued.

Keywords

Liver, lead, inhalation, oxidative stress, heavy metals, inflammation, meganuclei

Received 7 April 2017; Revised 17 November 2017; Accepted 4 December 2017

Introduction

Lead (Pb) is a heavy metal with no specific biological functions (Rainbow, 1985), and it is highly toxic even at small concentrations. The main sources of exposure are occupational and environmental. Pb poisoning is still considered a health problem, especially among children, whose brains are highly susceptible to the toxic effects of this element (Garg et al., 2007; Ollson et al., 2016). Pb uses the same routes of essential elements such as calcium, zinc, and iron to produce its toxic effect. Its main target organs are the nervous system, bone marrow cells, kidneys, and lungs (Aykin-Burns et al., 2003; Merrill et al., 2001; Toscano and Guilarte, 2005). Some reports also mention the liver as one of these target organs (Agarwal

et al., 2009; Berrahal et al., 2007; Garg et al., 2007; Milosevic and Maier, 2000; Zhang et al., 2009). Even though the oral route is the most studied, Pb inhalation

¹Cellular and Tissue Biology Department, School of Medicine, National University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico

²Department of Neurochemistry, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico

³Department of Medical Sciences, School of Medicine, National University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico

Corresponding author:

Teresa I Fortoul, Cellular and Tissue Biology Department, School of Medicine, National University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico.

Email: fortoul@servidor.unam.mx

should also be considered as a relevant source of exposure and toxic effects.

An important source of Pb is found in areas where Pb was used as a gasoline additive. Now, because of anti-pollution laws, its use has decreased. But these laws have not yet reached the industrial zones or improved the regulation of dumps. These are places where the metal is found in the soil, domestic dusts, drinking water, and enameled pottery (Aktar et al., 2017; Romieu et al., 1992). The incomplete combustion of these materials and their release into the atmosphere produces particles with a carbon nucleus with metals bound onto their surface, including Pb. These particles can be inhaled and transported into the respiratory system (Meneses-González et al., 2003).

Once the Pb moves across the alveolar barrier, it enters the bloodstream and its distribution depends on the specific affinity of the components of different tissues. The liver has a Pb accumulation rate of 33% (Mudipalli, 2007). Another source of Pb accumulation is the deglutition of particles that get stuck in the pharynx and then reach the liver through the vena cava (Montalvo, 2008). Therefore, the incorporation of Pb into the liver might occur orally or by inhalation.

Hepatic damage can be determined by histological evaluation and serum concentration of the enzymes produced by hepatocytes, such as alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The increase in ALT and AST levels indicate cell death and hepatic inflammation (Aktar et al., 2017; Ramadana et al., 2012). Also, hepatic damage induced by oxidative stress manifests itself with the presence of hepatic steatosis and it might be identified by the presence of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and/or nitrotyrosine, which are biochemical indicators of oxidative damage. In a previous study, the effect of inhaled ash containing a mixture of Cd, Cr, Cu, Mn, and Pb was evaluated. The study reported the presence of an infiltrate of mononuclear cells surrounding the portal triads and necrotic changes in the hepatocytes (Mani et al., 2007).

Studies reporting hepatic damage by Pb inhalation are limited. We decided to explore the morphological and functional hepatic changes by Pb inhalation in an experimental model in mice because the liver is a direct receptor of inhaled metals that enter the circulatory system.

Methods

Animals

Adult CD-1 male mice, weighing 33 ± 3 g, were obtained from the School of Medicine vivarium of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). All the mice were housed in hanging plastic cages and kept in a certified pathogen-free animal facility maintained at 21°C, with a 57% relative humidity and controlled lighting conditions (12:12-h light/dark regimen). All mice were provided *ad libitum* access to Purina Rat Chow and filtered water. They were randomly divided into three groups of 10 mice each. All experimental protocols were established in accordance to the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* from the Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, National Research Council of the National Academies USA (2010), and the Mexican Guideline for Animal Welfare (NOM-062-200-1999). The project was approved by the Research and Ethical Committee from the School of Medicine (#04-2005).

Exposure regime

Group I, the control group, inhaled only saline for 1 h, twice a week for 8 weeks. Group II inhaled lead acetate $1.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) for 1 h, twice a week for 8 weeks (Fortoul et al., 1999, 2005). Group III inhaled lead acetate for 8 weeks under the same conditions as group II. Group IV, the recovery group, first inhaled lead acetate for 8 weeks as previously described, then, the exposure was discontinued for 4 weeks. Afterward, they were killed. Inhalations were performed in a closed acrylic box (31.47 cm^3) connected to an ultra nebulizer (UltraNeb 99 DeVilbiss; Somerset, Pennsylvania, USA), with a 10 L/min continuous flux. The ultra nebulizer is designed to produce droplets in a 0.5–5 μm range.

We decided to use Pb acetate since it is the most frequently used compound for analyzing the effects of Pb in the organisms. This allows us to make comparisons with other works (Adegbesan and Adenagua 2005; Berrahal et al., 2007; Garg et al., 2007; Milosevic and Maier, 2000; Iavicoli et al., 2002; Zhang, 2009).

After the exposure, the mice were returned to their boxes and fed *ad libitum*. Exposure was twice a week (16 weeks) and lasted 1 h After 4 and 8 weeks of exposure, mice were anesthetized (i.p.) with 0.3 mg/mL

pentobarbital sodium (PiSa Agropecuaria S.A. de C.V., México) and perfused via aorta with saline, then 4% paraformaldehyde (pH 7.4) in phosphate buffer was applied for further histological and immunohistochemical analysis. Before the perfusion, blood samples were obtained to measure liver enzymes.

Determination of Pb concentration in the inhalation chamber

A solution of lead acetate [0.1 M] was nebulized. Three filters were positioned in the outlet of the nebulizer in three different occasions during the experiment for 10 min at a flow rate of 10 L/min. The filters were removed after the exposure and weighed. The procedure that was followed is described by Fortoul et al. (1996, 1999, 2004). The Pb concentration in the chamber was $1.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Pb levels measurement in liver and blood

Tissue samples (blood and liver) were stored in deionized water and maintained at -60°C until the analysis. Blood was digested with nitric acid in a 1:4 ratio and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4°C , the supernatant was stored at -60°C until analysis. Liver samples were digested by adding 5 mL of nitric acid in wet-weighted tissue and heated in a water bath at 80°C for 2 h. After digestion, the suspension was stored in sealed tubes at 4°C until the analysis. The samples were evaluated in an atomic absorption spectrophotometer (EAA) coupled with a graphite furnace (Analyst 600 with autosampler AS800; Perkin Elmer, Mexico City, México). As a quality control measure, Pb standards were used (Wisconsin State Laboratory of Hygiene, Madison, WI, USA) and the respective calibration curves were made.

Histological processing and analysis

Tissue samples were embedded in paraffin and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and Masson's Trichrome. Masson's Trichrome staining is used for the detection of collagen fibers, which can be observed in blue. The histological evaluation took into consideration the presence of edema, inflammatory infiltrate, its location, and nuclei size. The analysis was performed with a BX51 Olympus microscope (Olympus America, Mexico City) coupled to a digital camera (Evolution MP Color, Media Cybernetics, Rockville, Maryland, USA). Five fields from each slide were randomly obtained. One

slide was prepared per mouse, and three mice from each group were analyzed; obtaining then 15 fields per group; 75 nuclei were counted per group. The microphotographs were taken at $40\times$. Measurements were made using the Image J software (NIH, Bethesda, Maryland, USA). The normal range for the hepatocyte nucleus is 7–10 μm (Jago, 1969; Svoboda et al., 1971).

4-HNE and nitrotyrosine determination by immunohistochemistry

Tissue samples were deparaffinized and washed with distilled water. Antigen retrieval was achieved by incubation in Declere 10% (Cell Marque; Sigma, Rocklin, California, USA) at 15 psi for 3 min. Afterward, the slides were washed in phosphate-buffered saline (PBS) with Triton-albumin (10%) in a wet chamber. Endogenous peroxidase was inhibited with 3% H_2O_2 (JT Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) for 40 min and washed with PBS Triton (Sigma) for 5 min and then with Triton PBS-albumin (10%) for 10 min. Tissue samples were incubated at 37°C for 1 h in the presence of the following monoclonal antibodies: anti-4-HNE in a 1:1000 dilution (ID Laboratory) and anti-nitrotyrosine at a 1:100 dilution (Abcam Laboratory). Afterward, the slides were washed for five more minutes in PBS and Triton, and the fourth wash was performed with Triton PBS-albumin. Tissue samples were then incubated with the anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) at a 1:400 dilution at 37°C for 30 min. Three 5-min washes were then performed with Triton-PBS. The samples were incubated for 30 min at 37°C with streptavidin-HRP complex (Dako). Three more washes were done with Triton-PBS for another 5 min each. The samples were treated with 50 μL of hydrogen peroxide and 3,3-diaminobenzidine (DAB; Santa Cruz Biotechnology) to reveal the reaction. The sections were counter-stained with hematoxylin and mounted in resin to be analyzed with the light microscope. The slides lacking primary antibody were included also as negative controls.

Evaluation of liver function tests (LFTs)

Blood samples were obtained by intracardiac puncture at baseline 4 and 8 weeks after Pb exposure and after a 4-week post-exposure recovery period. The samples were centrifuged at 3000 rpm for 8 min at room temperature. The serum was separated and

Table 1. Lead concentrations in the blood and liver of the mice.^a

Groups	Blood ($\mu\text{g/dL}$)	Liver ($\mu\text{g/g}$)
I	0.22 ± 0.99^b	nd
II	218.76 ± 42.82^c	3.39 ± 0.27^c
III	287.06 ± 16.05^c	6.64 ± 0.25^d
IV	58.34 ± 10.37^d	1.18 ± 0.11^e

nd: not detected

^aGroup I is the control, groups II and III correspond to mice exposed to Pb for 4 and 8 weeks, respectively; group IV included mice with a 4-week recovery after discontinuing Pb exposure. Results are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences between groups, compared to the control group ($p < 0.05$).

analyzed according to the manufacturer's instructions on an automated Mark LX20 system (Automated Sample Processing System, Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, USA). The concentrations of ALT (IU/L), AST (IU/L), and lactate dehydrogenase (LDH; IU/L) were measured, and the De Ritis ratio (AST/ALT) was calculated (Brotos and Sikaris, 2013).

Statistical analysis

Results were expressed as \pm standard deviation of the mean. Comparisons between groups were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. Differences were considered statistically significant for values with $p < 0.05$. The relationship between Pb concentrations in blood and liver was evaluated using the Pearson correlation coefficient. The analysis was done with the SPSS 11.0 program (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois, USA).

Results

Pb determination in liver and blood

The Pb concentration in blood and liver of the three experimental groups showed significant differences compared to the control group (Table 1). The Pb concentration in the liver of the control group was below the detection limit (<0.0005 ppm, whereas in the two exposed groups (4 and 8 weeks), the concentration increased with exposure ($p < 0.05$; ANOVA, Tukey's). This time-exposure relationship was also observed in the blood (Table 1). In the group in which Pb exposure was discontinued, the Pb concentrations in the blood were similar to those in the control group.

Histological description

The histological changes in the liver of mice exposed to Pb are shown in Figure 1. The liver tissue showed regenerative changes in the structure of the lobules, with a loss in the radial distribution of the hepatocytes and non-specific proliferation; also, a decrease in the number of sinusoids was noticed. Binucleated cells, pyknotic nuclei, and evident anisonucleosis were observed with an increased in nucleocytoplasm ratio; as well as the presence of inflammatory infiltrate that increased with exposure time (Figure 1(c) and 1(d)).

On the eighth week of exposure, dilatation of the terminal hepatic and the portal vein branches was evident (Figure 1(e)), as well as changes in the sinusoidal patterns of the arrangement of the hepatocytes; steatosis, apoptosis, and mild fibrosis were also observed (Figure 1(f)). In addition, the inflammatory infiltrate was abundant with a predominance of lymphocytes and neutrophils located close to the central vein area and in some cases. This caused a disruption in the limiting plaques (Figure 1(e)). In the mice recovered from exposure, no inflammatory changes or fibrosis was observed.

An increase in the presence of hepatocytes with meganuclei on the first week of exposure was observed in Figure 2. During the following weeks, its presence increased. There was no statistical difference in meganuclei percentage on the 4-week recovery group compared to the control group (Figure 2(b)); however, statistically significant differences were observed in the Pb-exposed groups ($p < 0.05$; ANOVA) (Figure 3).

4-HNE and nitrotyrosine analysis by immunohistochemistry

Using the immunohistochemistry technique for 4HNE (see Figures 4(a) and 5), a significant increase in color density (pixels/inch) was observed in mice exposed to Pb ($p < 0.05$; ANOVA, Tukey's), suggesting that oxidative stress was higher in the Pb-exposed groups. 4-HNE increased since the fourth week, with the highest color density registered at week 8 (see Figure 4(c) and (e)). However, in the discontinued-exposure group, no significant differences were observed (Figure 5).

Nitrotyrosine immunohistochemistry showed a significant increase ($p < 0.05$; ANOVA, Tukey's) in color density (pixels/inch) on the group of mice exposed to Pb (see Figures 4 and 5) indicating an increase in nitrosative stress. The increase was observed from the fourth week, obtaining greater

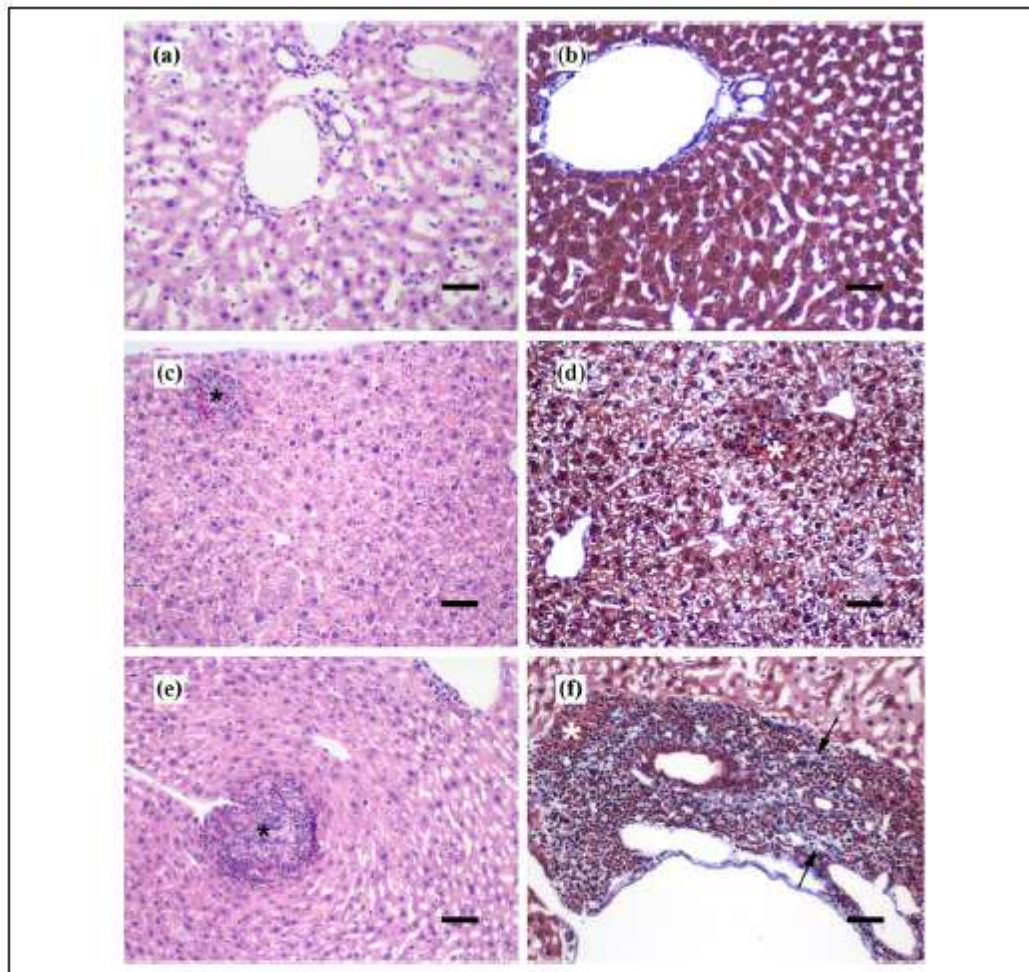


Figure 1. Histological changes in the liver from mice. (a) and (b) show the liver from control mice; (c) and (d) liver micrographs from mice Pb-exposed for 4 weeks. (e) and (f) At a 8-week exposure time, the presence of inflammatory infiltrate of neutrophils and lymphocytes was observed; (a), (c), and (e): H&E and (b), (d), and (f): Masson's trichrome. Note: inflammatory infiltrate (*) and fibrosis (→). Scale bars: 30 μ m. Pb: lead.

color density at week 8 (see Figure 4(d) and (f), respectively). The density measured in the discontinued exposure group was similar to the one of the control group (Figure 5).

Serum LFTs

Differences in LFTs were observed in the 4-week Pb-exposed group compared to the control group (Table 2). ALT increased after 4 weeks and

decreased on the eighth week, however in the discontinued exposure group, a slight increase was noticed. For AST, only the Pb-exposed groups showed an increase compared to the control group. The AST/ALT ratio (De Ritis ratio) in the exposed groups at 4 and 8 weeks was smaller than the control group's ratio. In the group in which exposure to Pb was discontinued, the AST/ALT ratio was greater than the ratio of the control group. For LDH, an increase was observed in all groups.

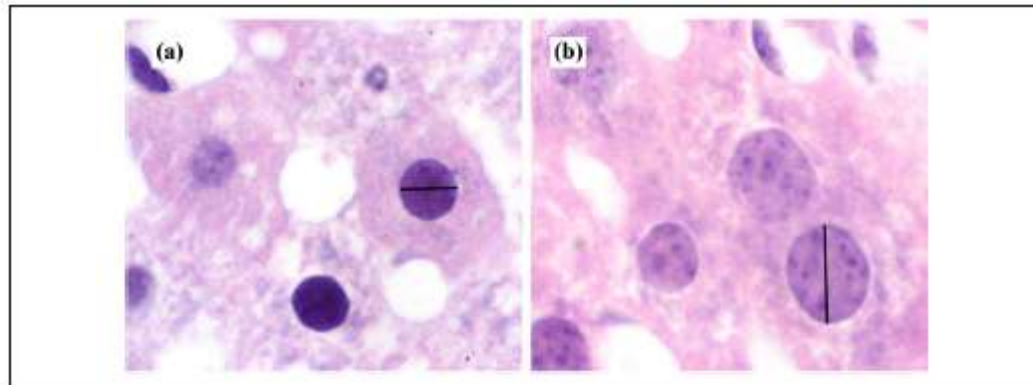


Figure 2. Differences in hepatocytes nuclear size. (a) Nucleus from control hepatocyte measured 5.7 μm and (b) nucleus from 8-week Pb-exposed mouse hepatocyte measured 15 μm (H&E). Pb: lead.

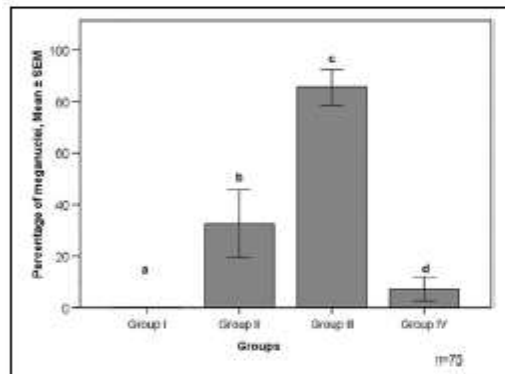


Figure 3. Percentage of meganuclei determined in the control, Pb-exposed mice, and suspended Pb-exposure group. Different letters indicate statistically significant differences between groups. Pb: lead.

Discussion

Inhaled Pb reached the liver and induced histological and functional changes that were evident at the fourth and eighth week of exposure. Later on, the damage decreased when the exposure was suspended after 4 weeks.

The concentrations of Pb in the liver and blood of exposed mice indicated that Pb is absorbed in the lungs through the alveoli and then reaches the systemic circulation and the liver via the hepatic arteries. Finally, this metal is stored in the liver, which is the soft tissue that can accumulate the highest concentrations of this element (Mudipalli, 2007).

The factors that contribute liver susceptibility are well-known. First, the xenobiotics can be transported to the liver through the hepatic portal vein and hepatic arteries. The second factor has to do with the ability of the liver to metabolize xenobiotics. Many of the biotransformation reactions are oxidative reactions, which produce reactive metabolites that can induce hepatic lesions (Hodgson and Levi, 2004).

Histological changes

Acute and chronic infiltrate was identified around the portal triads and in the arteries and veins, as reported by Mani et al. (2007). In other studies, Pb poisoning has been associated with a significant decrease in hepatocyte survival (Iavicoli et al., 2002) and to an increase in the number and severity of pathological alterations such as foci of cell necrosis and apoptosis (Sánchez-Chardi et al., 2009). These changes were also observed in this study. Our findings corroborate those reported by Damek-Poprawaa and Sawicka-Kapustab (2004) who observed nuclear polymorphisms, cell vacuolization, hepatocyte degeneration as well as interstitial fibrosis in the affected rodents.

The increase of hepatocytes with meganuclei is known as megalocytosis, which has been associated with the inhibition of hepatocyte mitosis and the presence of fibrosis near the central vein and proliferation of the bile ducts (Svoboda et al., 1971). Inhibition of mitosis has been associated with hepatotoxic substances such as carbon tetrachloride and lasiocarpine (Jago, 1969). This change might be interpreted as an increase in nuclear polyploidy. However, transcription and translation processes (i.e. RNA synthesis and

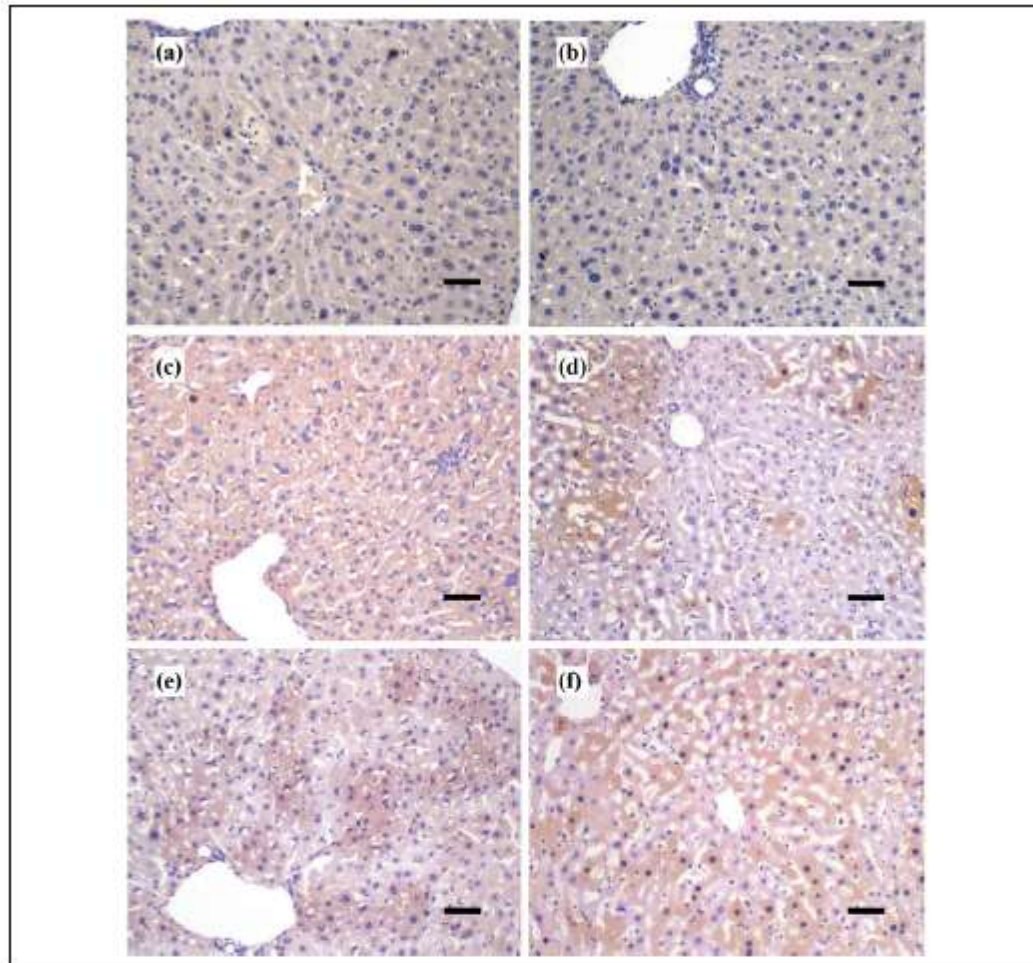


Figure 4. 4-HNE and nitrotyrosine immunohistochemistry for control and Pb-exposed groups. (a) and (b) Control group. The mark for 4-HNE and nitrotyrosine was not observed in controls. (c) and (d) Pb-exposed groups for 4 weeks (4-HNE and nitrotyrosine, respectively). A positive mark was observed for both markers. (e) and (f) 8-week exposed group (4-HNE and nitrotyrosine, respectively). A positive mark is observed for both markers. Scale bar: 30 μ m. Pb: lead; 4-HNE: 4-hydroxynonenal.

RNA polymerase activity) remain intact in hepatic megalocytes; hence, these cells are morphologically and functionally viable except when they are in a hypertrophic process and are unable to divide (Downing and Peterson, 1968; Svoboda et al., 1971). The nuclear changes found in this study also show the regenerative capacity of the liver and was previously reported in a study of subchronic vanadium exposure by inhalation in the liver (Cano-Gutierrez et al., 2012). Megalocytosis occurs when the hepatocytes

are stimulated to divide after a regenerative stimulus and mitosis is inhibited but not DNA synthesis (Dandevi et al., 2003). Jarrar and Taib (2012) reported that after a *p.o.* administration in rats, lesser nuclear changes occurred compared to those reported in this study. This might suggest that Pb inhalation could produce more liver damage as shown in the present study.

Steatosis indicates reversible injury in organs and could be the consequence of a direct damage of the

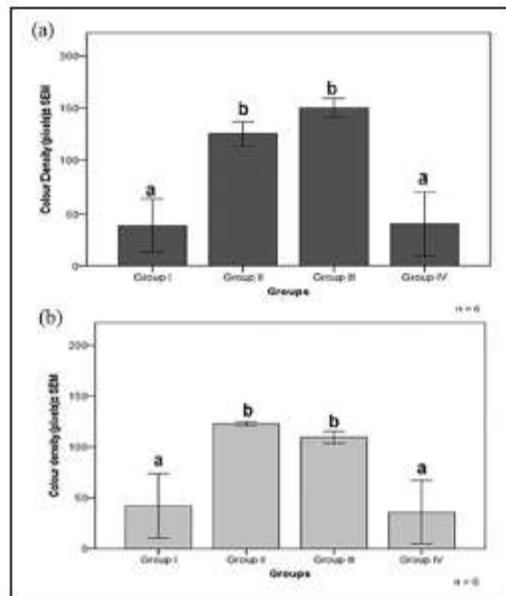


Figure 5. Density mean values for 4-HNE (a) and nitrotyrosine (b) in liver Pb-exposed mice [0.1 M]. Group I is the control, groups II and III correspond to mice exposed to Pb for 4 and 8 weeks, respectively; group IV included mice with a 4-week recovery after discontinuing Pb exposure ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). An increase in color density was observed in the Pb-exposed groups. The decrease in values was observed in the 4-week suspended exposure group. Different letters indicate statistically significant differences.

cellular membranes, the mitochondrion or the rough endoplasmic reticulum (RER; Haschek et al., 2010). In this case, the cause seems to be Pb inhalation. The mitochondrial damage might interfere with β -oxidation of triglycerides and their accumulation in the cytoplasm; in addition, the damage to the RER might result in the synthesis of less lipid-transport proteins

and a decrease in the synthesis of the enzymes in charge of β -oxidation and their accumulation in the cytoplasm (Haschek et al., 2010). This change has also been described after exposure to other toxins (carbon tetrachloride, nickel; Hodgson and Levi, 2004; Varg et al., 2005) and to a lesser degree in *p.o.* Pb administration (Jarrar and Taib, 2012).

Biochemical changes

Alterations in hepatic function tests. Elevated levels of ALT and AST are associated with hepatic steatosis and necrosis. Of the two transaminases (ALT and AST), ALT is thought to be more specific for hepatic injury because it is present mainly in the hepatocytes' cytosol and it is found at low concentrations in other organs. AST has cytosolic and mitochondrial forms and it is present in the liver, heart, skeletal muscle, kidneys, brain, pancreas, and lungs. The increase of enzyme activity may be explained by the presence of hepatobiliary lesions because of tissue breakdown. In order to metabolize these amino acids, the process of transamination is enhanced. This leads to an increase of AST and ALT activity (Garg et al., 2007).

LDH is a less specific marker for hepatocellular necrosis, so the increase in the LDH levels before the fourth week of suspended exposure could indicate damage in other tissues (Pratt and Kaplan, 2000). The De Ritis ratio suggests severe liver damage on the fourth and eighth week of exposure until it was suspended; only the acute inflammatory changes remained (Brotos and Sikanis, 2013).

Oxidative stress. The increase in nitrotyrosine and 4-HNE during the exposure suggests that the direct transport of Pb to the liver from the lungs produces free radicals and oxidative stress in the liver. These free radicals and reactive oxygen species (ROS) have the ability to oxidize lipids and proteins, which we

Table 2. Serum LFTs of the mice.^a

Enzyme	Group I	Group II	Group III	Group IV
ALT (IU/L)	30.3 \pm 7.7 ^b	47.7 \pm 6.2 ^b	23.1 \pm 5.4 ^b	36.5 \pm 3.9 ^b
AST (IU/L)	39.6 \pm 4.7 ^b	168.6 \pm 11 ^c	72.7 \pm 10.2 ^c	18.4 \pm 4.2 ^b
LDH (IU/L)	126.3 \pm 61 ^b	1443.3 \pm 61.1 ^c	1225.7 \pm 86 ^c	1309.0 \pm 106.6 ^b
AST/ALT	1.32 \pm 0.16 ^b	3.67 \pm 0.46 ^c	3.21 \pm 0.33 ^c	0.51 \pm 0.11 ^d

ALT: Alanine aminotransferase, AST: Aspartate aminotransferase, LDH: lactate dehydrogenase; AST/ALT: De Ritis ratio; LFT: liver function test.

^aGroup I is the control, groups II and III correspond to mice exposed to Pb for 4 and 8 weeks, respectively; group IV included mice with a 4-week recovery after discontinuing Pb exposure. Results are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences between groups, compared to the control group ($p < 0.05$)

observed with the increment of the concentrations of 4-HNE and nitrotyrosine (Fortoul et al., 2005, 2010).

Lipid peroxidation mainly affects structures rich in polyunsaturated fatty acids. This process leads to lipid degradation and results in a variety of cytotoxic compounds, such as 4-hydroxy 2-nonenal (4-HNE) aldehydes. In the mitochondria, this process can lead the cell directly to necrosis or apoptosis (Ott et al., 2007).

In addition, nitric oxide (NO) and its metabolites interact with ROS to generate protein nitration that carries on to the formation of nitrotyrosine, which is one of the changes that occur during oxidative/nitrosative stress (Floriano-Sánchez et al., 2006). Proteins may be modified by oxidation, such as the irreversible formation of di-tyrosine and its carbonylation in arginine and lysine residues. In such cases, proteins may be degraded (Ott et al., 2007). Pb might also induce oxidative stress by decreasing the activity of the anti-oxidative enzymatic systems (Adenuga and Adegbesan, 2007; Sieg and Billings, 1997; Zhong and Yin, 2015).

Finally, the findings in the suspended-exposure group suggest that the biochemical and histological changes observed were reversible. This is reinforced by the De Ritis ratio.

Conclusion

In this report, histological and biochemical liver changes were observed after Pb inhalation. An increase in blood and liver Pb concentrations was observed during Pb exposure, which decreased when the exposure was suspended, suggesting that the liver efficiently eliminated the metal. The main mechanism of toxicity for some metals is the production of oxidative/nitrosative stress that was evidenced in this study as an increment in 4-HNE and nitrotyrosine during the exposure. There are limited reports of liver damage after Pb inhalation, especially in relation to suspended particulate matter in air-polluted cities (Skerfving and Bergdahl, 2007). In this case, Pb might induce more functional consequences compared to oral administration, which is the more explored intoxication route.

Authors' note

Elena S González Rendón is a PhD student of Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, and acknowledges the support given by this postgraduate program. This manuscript is required for Elena S González Rendón in order to obtain

the PhD degree from the Posgrado en Ciencias Biológicas, (UNAM) CVU 225692.

Acknowledgements

Authors are grateful to Amardo Zepeda-Rodríguez, Francisco Pasos-Nájera and Raquel Guerrero-Alquicira. Also to Dr. Enrique Pinzón Estrada, Dr. Ismael Torres Saldaña, and Dr. Victor Manuel Salgado Alfaro from the vivarium from the School of Medicine, UNAM; also authors thank Alejandra Núñez-Fortoul for the English edition of the manuscript.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Adegbesan BO and Adenuga GA (2005) Effect of lead exposure on liver lipid peroxidative and antioxidant defense systems of protein—undernourished rats. *Biological Trace Element Research* 116: 220–225.
- Agarwal S, Roy S, Atish R, et al. (2009) Arsenic trioxide and lead acetate induce apoptosis in adult rat hepatic stem cells. *Cell Biology and Toxicology* 25: 403–413.
- Akter S, Jahan M, Alam S, et al. (2017) Individual and combined effects of arsenic and lead on behavioral and biochemical changes in mice. *Biological Trace Element Research* 177: 288–296.
- Aykin-Burns N, Laegeler A, Kellogg G, et al. (2003) Oxidative effects of lead in young and adult Fisher 344 rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 417–420.
- Berrahal A, Nehdi A, Hajjaji N, et al. (2007) Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Competus Rendus Biologies* 330: 581–588.
- Brotos M and Sikaris K (2013) The De Ritis ratio: the test of time. *Clinical Biochemistry Review* 34: 117–130.
- Cano-Gutiérrez G, Acevedo-Nava S, Santamaria A, et al. (2012) Hepatic megalocytosis due to vanadium inhalation: participation of oxidative stress. *Toxicology and Industrial Health* 28(4): 353–360.
- Damek-Poprawaa M and Sawicka-Kapustab K (2004) Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environmental Research* 76(1): 72–78.

- Danadevi K, Rozati R, Banu B, et al. (2003) DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology* 187: 183–193.
- Dowing D and Peterson J (1968) Quantitative assessment of the persistent antimetabolic effect of certain hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids on rat liver. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 46: 493–502.
- Floriano-Sánchez Cleva V, Medina CO, et al. (2006) Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radical Research* 40(5): 523–533.
- Fortoul TI, Avila-Costa MR, Espejel-Maya G, et al. (2004) Metal mixture inhalation (Cd-Pb) and its effects on the bronchiolar epithelium. An ultrastructural approach. *Toxicology and Industrial Health* 20: 69–75.
- Fortoul T, Saldivar I, Tovar T, et al. (1996) Metals in lung tissue from autopsy cases in México city residents. Comparison between cases from 1950s and the 1980s. *Environmental Health Perspectives* 104: 630–632.
- Fortoul TI, Saldivar L, Espejel-Maya G, et al. (2005) Inhalation of cadmium, lead or its mixture; Effects on the bronchiolar structure and its relation with metal tissue concentrations. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 329–334.
- Fortoul T, Salgado C, Moncada S, et al. (1999) Ultrastructural findings in the murine nonciliated bronchiolar cells (NCBC) after subacute inhalation of lead acetate. *Journal Acta Veterinaria Brunensis* 68: 51–55.
- Fortoul TI, Rojas-Lemus M, Avila-Casado MC, et al. (2010) Endogenous antioxidants and nasal human epithelium response to air pollutants: genotoxic and immunocytochemical evaluation. *Journal of Applied Toxicology* 30: 661–665.
- Garg M, Badhu H, Kumar A, et al. (2007) Lead induced alterations in protein-deficient rat liver-role of zinc. *Toxicological and Environmental Chemistry* 89: 523–533.
- Haschek WM, Rousseaux CG and Wallig MA (eds.) (2010) The liver. In: *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, 2nd ed. Canada Elsevier Inc, pp. 197–236.
- Hodgson E and Levi P (2004) Hepatotoxicity. In: Hodgson E (ed) *A Textbook of Modern Toxicology*, 3rd ed. USA: John Wiley & Sons Inc, pp. 262–273.
- Iavicoli I, Carelli G, Stanek E, et al. (2002) Effects of per os lead acetate administration on mouse hepatocyte survival. *Toxicology Letters* 129: 143–149.
- Jago M (1969) The development of the hepatic megalocytosis of chronic pyrrolizidine alkaloid poisoning. *American Journal Pathology* 56: 405–421.
- Jarrar BM and Taib NT (2012) Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 203–210.
- Lefkowitz J (1999) Hepatic granulomas. *Journal of Hepatology* 30(1): 40–45.
- Mani U, Prasad AK, Suresh Kumar V, et al. (2007) Effect of fly ash inhalation on biochemical and histomorphological changes in rat liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 126–133.
- Meneses-González F, Richardson V, Lino-González M, et al. (2003) Blood lead levels and exposure factors in children of Morelos State, Mexico. *Salud Publica Mex* 45(2): 203–208.
- Merrill C, Morton P, and Soileau S (2001) Metals. In: Wallace Hayes A (ed) *Principles and Methods of Toxicology*. USA: Taylor & Francis, pp. 649–698.
- Milosevic N and Maier P (2000) Lead intercellular signaling between hepatocytes and Kupffer cells. *European Journal of Pharmacology* 401: 317–328.
- Mudipalli A (2007) Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian Journal of Medical Research* 126: 518–527.
- Montalvo A (2008) Una Mirada al Sistema Digestivo. In: Fortoul T and Varela M (eds) *Una Mirada al Mundo Microscópico*. México: Prentice Hall, pp. 275–301.
- Ollson CJ, Smith E, Herde P, et al. (2016) Influence of co-contaminant exposure on the absorption of arsenic cadmium and lead. *Chemosphere* 30: 1–9.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, et al. (2007) Mitochondria oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12: 913–922.
- Pratt DS and Kaplan MM (2000) Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *The New England Journal Medicine* 342: 1266–1271.
- Rainbow P (1985) The biology of heavy metals in the sea. *International Journal of Environmental Studies* 25: 195–211.
- Ramadana A, Soliman G, Sawsan S, et al. (2012) Evaluation of the safety and antioxidant activities of *Crocus sativus* and Propolis ethanolic extracts. *Journal of Saudi Chemical Society* 16(1): 13–21.
- Romieu I, Palazuelos E, Meneses F, et al. (1992) Vehicular traffic as a determinant of blood lead levels in children: a pilot study in Mexico City. *Archives of Environmental Health* 47: 246–249.
- Sánchez-Chardi A, Oliveira Ribeiro CA, and Nadal J (2009) Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere* (76): 387–394.

- Sieg DJ and Billings RE (1997) Lead/cytokine-mediated oxidative DNA Damage in cultured mouse hepatocytes. *Toxicology Applied Pharmacology* 199: 100–107.
- Skerfving S and Bergdahl IA (2007) Lead. In: Nordberg GE, Fowler BA, Nordberg M and Friberg L (eds) *Handbook on the Toxicology of Metals*, 3rd ed. London: Elsevier. pp. 599–643.
- Svoboda D, Reddy J, and Bunyatvej S (1971) Hepatic megalocytosis in chronic lasiocarpine poisoning. *American Journal of Pathology* 65(2): 399–409.
- Toscano ChD and Guilarte TR (2005) Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Research Reviews* 49: 529–554.
- Tsalev DL and Zaprianov ZK (1984) Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health. In: Tsalev DL (ed) *Analytical Aspects and Health Significance Practice*, vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. pp. 243–244.
- Varg I, Ágnes S, Norbert S, et al. (2005) Determination of trace elements in human liver biopsy samples by ICP–MS and TXRF: hepatic steatosis and nickel accumulation. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 383(3): 476–482.
- Zhang R, Niu Y, Li Y, et al. (2009) Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice. *Environmental Toxicology Chemistry* 30: 52–60.
- Zhong H and Yin H (2015) Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biology* 4: 193–199.