Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Posgrado en Ciencias Químicas

Bioquímica y Biología Molecular

TESIS:

“PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL SISTEMICA DE RATAS TRATADAS CON CADMIO”

Presenta:

M.C Celeste Santamaría Juárez

Bajo la dirección de:

D.C José Gustavo López y López

D.C Eduardo Brambila Colombres

Puebla, Puebla

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato Ciclasa
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Apo	Apocinina
BH_4	Tetrahidrobiopterina
Ca^{2+}	Calcio
CaM	Calmodulina
CAT	Catalasa
CaV	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
CDR	Curvas dosis respuestas
CMLV	Células del musculo liso vascular
COXs	Ciclooxigenasas
DAG	Diacilglicerol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EO	Estrés oxidativo
Emax	Efecto máximo
ERO	Especies reactivas de oxigeno
ET	Endotelina
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FC	Frecuencia cardiaca
FMN	Flavín mononucleótido
GC	Gasto cardiaco
GCs	Guanilato Ciclasa Soluble
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSH	Glutatión reducido
GPx	Glutatión Peroxidasa
GR	Glutatión Reductasa
HA	Hipertensión arterial
HAS	Presión Arterial Sistémica
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
MDA	Malondialdehído
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLC20	Cadena Ligera de la Miosina
MLV	Musculo liso vascular
NAD(P)H	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
$O_2^{\cdot -}$	Anión superóxido
$ONOO^-$	Peroxinitrito
PA	Presión Arterial
PAD	Presión Arterial Diastólica

PAS	Presión Arterial Sistólica
pD2	Dosis efectiva 50
PGG_2	Prostaglandina G_2
PGI_2	Prostanglandina A_2
PIP_2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLA_2	Fosfolipasa A_2
PLC	Fosfolipasa C
RP	Resistencias vasculares periféricas
RS	Retículo sarcoplasmico
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SOD	Superóxido dismutasa
SRA	Sistema renina angiotensina
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TP	Receptor TP
TXA_2	Tromboxano A_2
4-HDA	4-Hidroxialquenales
5-HT	Serotonina

INDÍCE

I. INTRODUCCIÓN 10
1. Estructura de la pared vascular 10
1.1 Clasificación de los vasos sanguíneos en el sistema vascular 12
1.1.1 Arterias elásticas 13
1.1.2 Arterias musculares o de resistencia 13
1.1.3 Arterias musculares de conductancia 14
1.1.4 Vasos de intercambio 14
1.1.5 Vasos de capacitancia 14
1.2 Mecanismo de regulación del tono vascular 15
1.2.1 Sistema nervioso autónomo 15
1.2.2 Mecanismos endócrinos 17
1.2.3 Mecanismos intrínsecos 18
1.2.3.1 Factores endoteliales 20
1.2.3.1.1. Óxido nítrico (NO) 21
1.2.3.1.2 Prostanglandinas 26
1.2.3.1.3 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) 26
1.2.3.4 Sustancias vasoconstrictoras 27
1.2.3.4.1 Noradrenalina 27
1.2.3.4.2 Angiotensina II 28
1.2.3.4.3 Endotelina 28
1.2.3.4.4 Tromboxano A_2 29
1.2.3.4.5 Serotonina 30
1.3 Presión arterial 31
1.3.1 Factores que determinan la presión arterial 31
1.3.1.1 Gasto cardiaco y resistencia periférica 32
1.4 Mecanismos de regulación de la presión arterial 33
1.4.1 Regulación de la presión arterial a corto plazo 33
1.4.2 Regulación de la presión arterial a mediano y largo plazo 34
1.5 Hipertensión arterial 36
1.5.1 Epidemiología de la HTA 37
1.5.2 Fisiopatología de la hipertensión 38

1.5.2.1 Alteraciones vasculares: endotelio y musculo liso vascular 38
1.5.2.2 Remodelado vascular 39
1.5.2.3 Otros marcadores de disfunción endotelial 43
1.5.2.3.1 Estrés oxidativo 43
1.5.2.3.1.1 Las fuentes de ERO en la pared vascular 46
1.5.2.3.1.1.1 NAD(P)H oxidasa y su relación con la hipertensión arterial 48
1.6 Etiología de la hipertensión arterial 49
1.6.1 Cadmio como factor de riesgo en la hipertensión arterial 50
II ANTECEDENTES 52
2.1 Cadmio y su asociación a la hipertensión arterial sistémica 52
2.2 Efectos del cadmio en la pared vascular 53
2.3 Estrés oxidativo generado por cadmio 54
2.4 Disfunción endotelial generada por cadmio 57
2.5 Participación de agentes vasoconstrictores durante la hipertensión arterial generada por cadmio 58
III. JUSTIFICACIÓN 60
IV. HIPOTESIS 64
V. OBJETIVOS 64
5.1 OBJETIVO GENERAL 64
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES 64
VI. MATERIAL Y MÉTODOS 65
5.1 Animales de experimentación 65
6.2 Modelos experimentales 65
6.2.1 Modelo agudo 65
6.2.2 Modelo crónico 65
6.2.3 Modelo administración in vivo de Apo 65
6.3 Medición de la presión arterial 66
6.4 Estudios de reactividad vascular 66
6.4.1 Aislamiento de la aorta obtención de anillos arteriales 66
6.4.2 Medición de presión de perfusión a través de la arteria mesentérica 66
6.5 Protocolos experimentales 66
6.5.1 Registro de tensión isométrica 66

6.5.1.1 Curvas concentración respuesta a acetilcolina en aorta 67
6.5.1.2 Curvas concentración respuesta a agonistas contráctiles en aorta 67
6.5.2 Registro de presión de perfusión en arteria mesentérica 68
6.5.2.1 Curvas concentración respuesta a acetilcolina en arteria mesentérica 68
6.5.2.1 Curvas concentración respuesta a agonistas contráctiles 69
6.7 Parámetros bioquímicos 69
6.7.1 Determinación de marcadores de lipoperoxidación 69
6.7.1.1 Ensayos de MDA y 4-HDA 69
6.7.2 Actividad enzimática 70
6.7.2.1 Ensayos de actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx) 70
6.7.2.2 Ensayos de actividad enzimática de la glutatión reductasa (GR) 70
6.8 Análisis estadístico 71
6.8 Diagrama de trabajo 72
6.9 Diagrama de trabajo (modelo *in vivo*) 73
VII. RESULTADOS 74
7.1 Resultados obtenidos con el modelo de intoxicación aguda de cadmio 74
7.1.1 Características generales del modelo de administración aguda a cadmio 74
7.1.2. Efecto de la ACh sobre el efecto relájante del NO en aorta de ratas con exposición aguda a cadmio 74
7.1.3 Efecto de la fenilefrina en aorta de ratas con exposición aguda a cadmio 74
7.1.4 Efecto de la 5-HT en aorta de ratas con exposición aguda a cadmio 75
7.1.5 Efecto de la ACh en lecho mesentérico de ratas con exposición aguda a cadmio 77
7.1.6 Efecto de la fenilefrina en lecho mesentérico de ratas con exposición aguda a cadmio 78
7.1.7 Efecto de la 5-HT en lecho mesentérico de ratas con exposición aguda a cadmio 78
7.2 Resultados obtenidos con el modelo de intoxicación crónica de cadmio 79
7.2.1 Características generales del modelo de administración crónica a cadmio 79
7.2.2 Evaluación de la respuesta relajante en aorta durante la hipertensión arterial generada por cadmio a una exposición crónica de 8 semanas 81
7.2.3 Efecto de la fenilefrina en aorta de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas 83
7.2.4 Efecto de la 5-HT en aorta de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas 86

7.2.5 Efecto del U46619 en aorta de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas 88

7.2.6 Evaluación de la respuesta relajante en lecho mesentérico de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas..... 91

7.2.7 Efecto de la fenilefrina en lecho mesentérico de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas 92

7.2.8 Efecto de la 5-HT en lecho mesentérico de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas 93

7.2.9 Efecto de la administración crónica de cadmio sobre los niveles de MDA y 4-HDA en aorta y lecho mesentérico de rata 93

7.3 Resultados obtenidos con el modelo de intoxicación crónica de cadmio y tratamiento in vivo de apocinina 97

7.3.1 Características generales del modelo de administración *in vivo* de apocinina durante la exposición crónica a cadmio..... 97

7.3.2 Efecto de la administración *in vivo* de Apo sobre la disfunción endotelial en aorta de ratas con hipertensión arterial inducida por cadmio a una exposición crónica de 8 semanas. 98

7.3.3 Efecto de la administración *in vivo* de Apo sobre la respuesta contráctil de fenilefrina en anillos de aorta de ratas con hipertensión arterial inducida con cadmio..... 99

7.3.4 Efecto de la administración *in vivo* de Apo sobre la respuesta contráctil de 5-HT en anillos de aorta de ratas con hipertensión arterial inducida con cadmio..... 100

VIII. DISCUSIÓN 102

8.1 Intoxicación aguda con cadmio. 102

8.2 Intoxicación crónica con cadmio. 104

8.2.1 Efecto de la administración crónica de cadmio en la presión arterial sistémica. ... 105

8.2.2 Estudios de reactividad *in Vitro* 106

8.2.3 Efecto de la incubación de apocinina (inhibidor de la NAD(P)H oxidasa sobre la disfunción endotelial inducida por cadmio 109

8.2.4 Inducción del estrés oxidativo y modulación del sistema antioxidante por cadmio 110

8.3 Estudios de reactividad vascular en un modelo *in Vivo* 114

IX CONCLUSIONES 115

X. PERSPECTIVAS..... 115

XI BIBLIOGRAFÍA..... 116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una arteria. 11
Figura 2. Morfología de los vasos sanguíneos 12
Figura 3. Sistema de señalización adrenérgico. Las catecolaminas: adrenalina y noradrenalina. ... 17
Figura 4. Mecanismos implicados en la contracción y relajación del músculo liso vascular. …….20
Figura 5. Esquema de la estructura dominio de NOS mostrando los sitios de unión de cofactores y sustrato 22
Figura 6. Mecanismos de relajación inducidos por el NO 24
Figura 7. Los mecanismos que llevan a una disminución en la síntesis de NO 26
Figura 8. Mecanismo de acción de la Angiotensina II en el musculo liso vacular 28
Figura 9. Síntesis del TXA_2. Liberación de ácido araquidónico, de los fosfolípidos de la membrana 31
Figura 10. Regulación de la presión arterial a corto plazo 34
Figura 11. Sistema renina angiotensina aldosterona 36
Figura 12. Modulación de la función celular por las ERO durante la hipertensión 47
Figura 13. Sistema de registro para registro de contracción isométrica de aorta 68
Figura 14. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en anillos de aorta. 75
Figura 15. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en anillos de aorta 76
Figura 17. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en lecho mesentérico..... 77
Figura 18. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en lecho mesentérico 78
Figura 20 Efecto de la administración crónica de cadmio de Cd^{2+} (40 y 80 ppm) sobre los valores de presión arterial sistólica. 80
Figura 21. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en anillos de aorta 82
Figura 22. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la disfunción endotelial inducida por cadmio en anillos de aorta..... 83
Figura 23. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la disfunción endotelial inducida por cadmio en anillos de aorta..... 83
Figura 24. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en anillos de aorta 84
Figura 25. Participación de la NAD(P)H oxidasa sobre la respuesta contráctil a fenilefrina durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta 85
Figura 26. Participación de la NAD(P)H oxidasa sobre la respuesta contráctil a fenilefrina durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta. 85
Figura 27. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a 5-HT en anillos de aorta 86
Figura 28. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a 5-HT durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta 87
Figura 29. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a 5-HT durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta 88

Figura 30. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a U46619 durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta. 89
Figura 31. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a U46619 durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta 90
Figura 32. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a U46619 durante la HAS generada por cadmio. 90
Figura 33. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en lecho mesentérico..... 91
Figura 34. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina lecho mesentérico. 92
Figura 35. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a 5-HT lecho mesentérico..... 93
Figura 36. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre los niveles de MDA en aorta y lecho mesentérico de rata..... 94
Figura 37. Efecto de la administración crónica de cadmio en los niveles de 4-HDA en aorta y lecho mesentérico de rata..... 95
Figura 38. Efecto de la administración crónica de cadmio sobre la actividad enzimática de GPx en aorta y lecho mesentérico de rata 96
Figura 39. Efecto de la administración crónica de cadmio sobre la actividad enzimática de GR en aorta y lecho mesentérico de rata 97
Figura 40. Efecto de la administración in vivo de Apo en ratas con hipertensión arterial inducida por cadmio..... 98
Figura 41. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en aorta de ratas con administración *in vivo* de Apo 99
Figura 42. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en aorta de ratas con administración *in vivo* de Apo 100
Figura 43. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a 5-HT en aorta de ratas con administración *in vivo* de Apo..... 101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de presión arterial sistémica..... 37
Tabla 2. Factores hipertensinogénicos 50
Tabla 3. Efecto de la administración aguda de Cd^{2+} (0.25 ppm) sobre los valores de peso corporal, glucosa sanguínea y presión arterial sistólica 74
Tabla 4. Efecto de la administración crónica de cadmio de Cd^{2+} (40 y 80 ppm) sobre los valores de peso corporal y glucosa sanguínea. 80
Tabla 5. Efecto de la administración *in vivo* de Apo sobre los valores de peso corporal y glucosa sanguínea..... 97

I. INTRODUCCIÓN

1. Estructura de la pared vascular

La pared vascular esta formado por componentes celulares, células endoteliales, células musculares lisas, fibroblastos y componentes no celulares, la matriz extracelular. Estos componentes celulares y no celulares, pueden modificar su proporción aumentando, disminuyendo o reorganizándose, en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos [Touyz y Schiffrin, 2000]. La pared arterial está formada por tres capas celulares o túnicas dispuestas de manera concéntrica: una túnica adventicia, una túnica media y una túnica íntima **(Figura 1).**

La túnica adventicia separa el vaso sanguíneo de los tejidos adyacente, presenta terminaciones nerviosas perivasculares que llegan al vaso sanguíneo y ejercen sobre éste el control nervioso. La proporción de la pared ocupada por la adventicia es variable según el lecho vascular, siendo reducida en las pequeñas arterias cerebrales y mayor en las grandes arterias [Tang y Vanhoutte., 2010; Chatterjee y Catravas, 2007]. Los neurotransmisores liberados de las terminaciones nerviosas simpáticas y vagales modulan el tono vascular, también modula la respuesta a agentes vasoconstrictores como la angiotensina II (Ang II), al mediar la liberación de óxido nítrico (NO) endotelial a través de la activación de los receptores AT_2 de la Ang II presentes en esta capa. Por lo tanto, la adventicia tiene un papel importante en patologías como la aterosclerosis y la hipertensión [Messner y cols., 2009].

La túnica media está formada por células de músculo liso vascular (CMLV) que se disponen en espiral formando varias capas alrededor de la circunferencia del vaso, esta constituida por filamentos de actina y miosina. El número de capas de las CMLV dentro de la túnica media de las arterias se reduce al disminuir su diámetro. En la túnica media se localizan los receptores de neurotransmisores, factores locales y hormonas como la adrenalina, el NO, la angiotensina II, entre otros. Las CMLV se contraen o relajan en respuesta a diversos estímulos, como el aumento o disminución de las concentraciones de calcio, o agentes vasoconstrictores de esta forma reducen o aumentan el diámetro interno de la pared vascular, regulando así, el flujo sanguíneo [Vanhoutte y cols., 2009].

La túnica íntima o también llamado endotelio es considerado el principal órgano de regulación vascular con acción parácrina, autócrina y endócrina su función esta relacionada en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunes. El endotelio vascular se localiza en una posición anatómica estratégica entre la sangre y la pared vascular que le permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y el MLV. Las células endoteliales detectan variaciones de tipo mecanico, quimico y humoral. Las variaciones de tipo mecánico como cambios hemodinámicos de la presión o las fuerzas de cizallamiento de la sangre, de tipo químico como la presión de oxígeno, humorales como las modificaciones de los factores circulantes o locales además de cambios en sus interacciones con las plaquetas o los leucocitos. El endotelio va a traducir dichas modificaciones a través de la síntesis y liberación de factores biológicamente activos que van a regular la angiogénesis, las respuestas inflamatorias, la homeostasis, así como el tono y permeabilidad vascular. [Feletou y Vanhoutte, 2006]. Los factores endoteliales que participan en la modulación de la relajación y la contracción del MLV se clasifican en tres grupos los primeros son los factores relajantes derivados de endotelio, como la prostaglandina (PGI_2), el factor hiperpolarizante derivados de endotelio (EDHF) y el NO, los segundo son los factores contráctiles derivados de endotelio, como los endoperóxidos, el tromboxano (TXA_2), la Ang II y endotelina (ET)y por ultimo las especies reactivas de oxígeno (ERO).

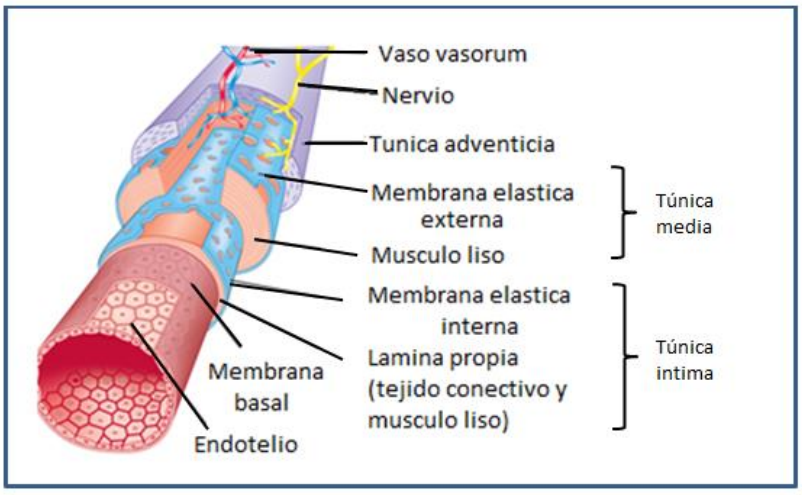


Figura 1. Estructura de una arteria. Vaso sanguíneo, presenta 3 capas características: la túnica intima, formada por el endotelio y la lámina elástica interna; la túnica media, formada por músculo liso y la lámina elástica externa; y la túnica adventicia formada por tejido conectivo fibroso, que representa la capa más superficial de la arteria. Se observa también la innervación simpática y parasimpática que se internaliza en la arteria para alcanzar al músculo liso de la túnica media y modular el tono muscular. Adaptado de Atlas de Histología, Biología Celular y Tisular 2014, pag.63.

1.1 Clasificación de los vasos sanguíneos en el sistema vascular

Los vasos sanguíneos se clasifican en: arterias elásticas, arterias musculares de conductancia, arterias musculares de resistencia, vasos de intercambio y vasos de capacitancia [Ross y cols., 2003; Levick, 2003] **(Figura 2).**

La función y la estructura de cada segmento del sistema vascular periférico varían según el órgano que suministra. Dentro de cada capa, la cantidad de fibrillas musculares y de colágeno varía, dependiendo del tamaño y la ubicación del vaso. Las arterias siempre están bajo alta presión, para adaptarse a este estrés, tienen una gran cantidad de tejido elástico y menos músculo liso. La presencia de elastina en los grandes vasos sanguíneos permite que estos vasos aumenten de tamaño y alteren su diámetro. Las arteria cuando llega a un órgano en particular, se divide en vasos más pequeños que tienen más MLV y menos tejido elástico, se estima que alrededor del 10% al 15% del volumen total de sangre está contenido en el sistema arterial, a medida que el diámetro de los vasos sanguíneos disminuye, la velocidad del flujo sanguíneo también disminuye, esta característica de alta presión sistémica y bajo volumen es típica del sistema arterial.

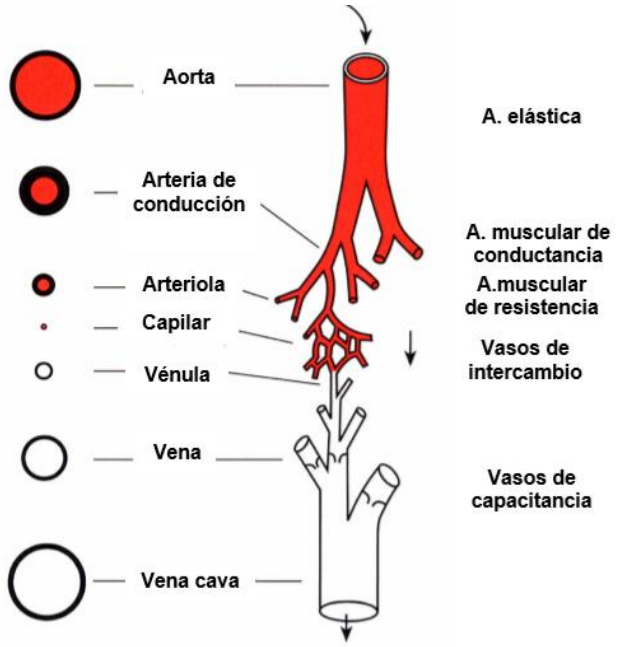


Figura 2. Morfología de los vasos sanguíneos. Diagrama representativo de la morfología de los diferentes vasos sanguíneos [Adaptado de Levick, 2003].

1.1.1 Arterias elásticas

Las arterias elásticas o arterias de conducción presentan un diámetro entre 1 y 2 cm, tienen una pared muy distensible porque su túnica media consiste en varias láminas de elastina que alternan con las capas del MLV. La elastina es una proteína extracelular que confiere e que las arterias elásticas se expandan alrededor de un 10 % en cada latido cardiaco lo que permite la expulsión de sangre. El papel fisiológico de las arterias elásticas es que son conductoras y reguladoras del caudal sanguíneo además permiten mantener un gradiente de presión relativamente constante a pesar de la acción de bombeo constante del corazón [Levick, J.R., 2003].

La aorta es una de las arterias de conducción más importantes, la capa más interna, la túnica íntima, está revestida por una sola capa de células endoteliales y unida por la lámina elástica interna; la capa media, está compuesta de CMLV, colágeno, elastina, fibroblastos y la capa más externa, la adventicia, es una capa delgada que contiene tejido conectivo, fibroblastos y vasa vasorum.

1.1.2 Arterias musculares o de resistencia

Las arterias musculares o de resistencia proporcionan sangre a los órganos y se componen principalmente de músculo liso. El sistema nervioso autónomo influye en el diámetro y la forma de las arterias. Responden a la necesidad del tejido de más nutrientes/oxígeno. Las arterias de resistencia tienen un papel significativo en la resistencia vascular sistémica debido a la falta de tejido elástico en las paredes. Las fenestras presentes en la lámina elástica interna de las arterias de musculares proporcionan vías para el contacto directo y la comunicación entre las células endoteliales. Estas interacciones de célula a célula se consideran esenciales para la integración de la vasoconstricción local y los efectos de vasodilatación, y para la coordinación de las respuestas vasculares en una red de vasos interconectados. Además, las características estructurales de la pared vascular, incluidas las fenestras, así como otros componentes celulares y de la matriz extracelular, cambian con relativa rapidez en respuesta a una gran cantidad de estímulos fisiológicos y patológicos

Las arterias de resistencia varían de 8 a 60 µm, se consideran parte de la vasculatura de resistencia que proporciona más del 80% de la resistencia al flujo sanguíneo en el cuerpo. En consecuencia, son vitales para la regulación de la hemodinámica, lo que contribuye al control de la presión arterial y la distribución regional de la sangre [Ross y cols., 2003].

1.1.3 Arterias musculares de conductancia

Las arterias musculares de conductancia se caracterizan por ser de mediano y pequeño calibre, un ejemplo de estas arterias son la arteria radial, las arterias cerebrales cerebrales y coronarias las cuales su diámetro osila entre 0.1-1 cm en humanos, presentan una túnica media que contiene más MLV y es más gruesa respecto al lumen que las arterias elásticas. La túnica media está formada por láminas de MLV entre las cuales hay fibras de colágeno y proteoglicanos su función es controlar la luz del vaso y regular el flujo sanguíneo. El grosor de la pared de las arterias de conductancia representan una cuarta parte del diámetro de la arteria, esta característica impide el colapso en los lugares en los que hay curvatura como es el caso del codo y la rodilla. [Levick, 2003].

1.1.4 Vasos de intercambio

Los vasos de intercambio de gases y metabolitos tienen lugar en los capilares, estos son numerosos y pequeños su diámetro es de 4-7 µm, la estructura de su pared es una sola capa de células endoteliales de 0.5 µm de grosor y carecen de capa de MLV. Aunque los capilares son muy estrechos, el lecho capilar presenta una resistencia baja al flujo baja y una caída modesta de la presión.

1.1.5 Vasos de capacitancia

Los vasos de capacitancia son vasos venosos que funcionan como depósitos, las venas contienen, dos tercios de sangre circulante aproximadamente por lo que se les denomina vasos de capacitancia un ejemplo de estos vasos son las venas periféricas que están inervadas por fibras nerviosas por lo que el volumen sanguíneo en el depósito venoso puede ser controlado activamente. El dametro de los vasos de capacitancia oscila entre 50-200 µm, están formadas por una túnica íntima, media y adventicia [Serafim y cols., 2001].

1.2 Mecanismo de regulación del tono vascular

El tono muscular es regulado a corto plazo por mecanismos extrínsecos e intrínsecos. Los mecanismos extrínsecos son la regulación nerviosa (simpática, parasimpática); la humoral y la hormonal. Los factores intrínsecos de la regulación del tono vascular están detereinados por la regulación autócrina, parácrina e intracrina, mediante los derivados del endotelio y del metabolismo celular. En la regulación a largo plazo se lleva acabo a través de la regulación neurohumoral, una regulación del tono vascular y el Sistema Renina Angiotensina (SRA).

1.2.1 Sistema nervioso autónomo

Las neuronas postganglionares simpáticas inervan los órganos implicados en la función del sistema cardiovascular asi como la mayoría de los vasos sanguíneos, las glándulas adrenales, el riñón y el corazón. La estimulación del sistema nervioso simpático produce un efecto cronotrópico e inotrópico positivo en el corazón, aumentando la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca. La estimulación simpática en los vasos sanguíneos sistémicos, produce un efecto vasoconstrictor que se traduce en un aumento de las resistencias periféricas totales. El efecto sobre el corazón y sobre las resistencias periféricas antes mencionadas generadas por la activación simpática produce una elevación de la presión arterial. Por otra parte también existe una descarga tónica de las fibras eferentes simpáticas que es responsable de la constricción tónica en los vasos de resistencia. Este tono simpático basal va a mantener parcialmente contraídas casi todas las arteriolas sistémicas, lo que produce pueda un aumento de la vasoconstricción al incrementar la actividad simpática o por un efecto vasodilatador, originada por una inhibición simpática disminuida por los agentes vasodilatadores. Por esta razón, su papel en la regulación del tono vascular es fundamental.

El sistema simpático y el parasimpático modulan las funciones inotrópicas y cronotrópicas del corazón y el tono vascular a través de la interacción de receptores específicos. Los receptores de noradrenalina que participan son los receptores α-adrenérgicos y β-adrenérgicos, también participan los receptotes colinérgicos, los receptores colinérgicos y adrenergicos constituyen el primer escalón del señalamiento celular. Las terminaciones

nerviosas simpáticas postganglionares que inervan los distintos órganos diana, incluidos los vasos sanguíneos son en su mayoría fibras adrenérgicas que liberan noradrenalina. La noradrenalina liberada por las terminaciones nerviosas adrenérgicas, así como la noradrenalina y la adrenalina circulantes se van a unir a receptores adrenérgicos específicos a través de los cuales ejercen sus acciones en los diferentes órganos diana. El sistema nervioso simpático también participa en el remodelado ventricular y en la hipertrofia ventricular.

La unión ligando receptor de la noradrenalina con sus receptores genera la activación de vías intracelulares que modifican, integran y transducen las señales del exterior. De esta forma las señales autonómicas son reguladas por medio de los receptores de la superficie celular y moduladas en múltiples puntos de las vías efectoras [Serafim y cols., 2001]. La modulación del tono vascular actúa sobre los receptores α adrenérgicos, los cuales son importantes en los cambios de presión. La familia de los receptores adrenérgicos que participan pertenece a los receptores α-adrenergicos, las isoformas de los receptores son los α_1 y α_2 adrenérgicos, receptores que intervienen en la modulación del tono vascular.

En el endotelio, la noradrenalina, se une a sus receptores α_2-adrenérgicos, los cuales están acoplados a proteínas Gi que inactiva a la adenilato ciclasa (AC), generando una disminución del segundo mensajero intracelular adenosin monofosfato cíclico (AMPc), lo que permite la apertura de canales de K^+ dependientes de voltaje [Peralta et al., 1987]. A nivel de las células del MLV, la noradrenalina interactúa con los receptores α_1-adrenergicos, receptores que están acoplados a proteínas Gq, estos promueven la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC), que genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2). El DAG estimula la proteína cinasa C (PKC), que participa en la sensibilización al calcio (Ca^{2+}) segundo mensajero que participa en la maquinaria contráctil, mientras que el IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmico (RS) por activación del receptor IP_3 localizados en el mismo. El aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, da lugara a que el Ca^{2+} se una a la cadmudulina (CaM) formando de esta manera el complejo Ca^{2+}-CaM, este complejo se une a la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) favoreciendo de esta manera la contracción muscular.

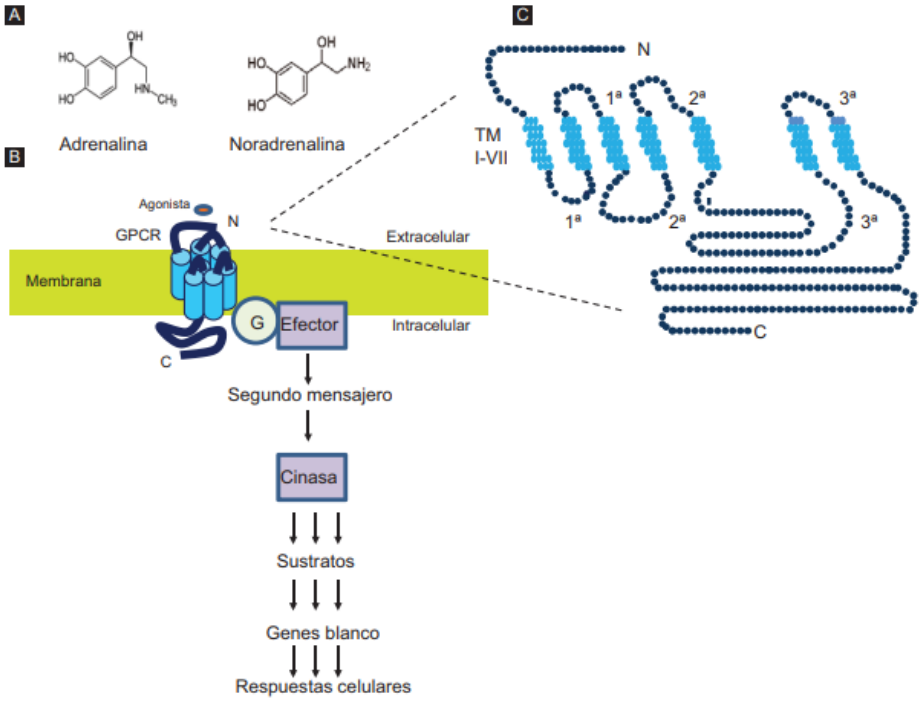


Figura 3. Sistema de señalización adrenérgico. Las catecolaminas: adrenalina y noradrenalina (A) se unen a receptores blancos de 7 cadenas transmembranales conocidos como receptores acoplados a proteínas G (B) (GPCR), las cuales constan de tres asas extracelulares, 3 intracelulares, un amino extracelular (N) y carboxilo intracelular(C). Localizado en la membrana plasmática al ser activado por el agonista se acopla a una proteina G que activa a una proteína efectora, la cual genera segundos mensajeros como las cinasas. Tomado de Hirano, 2007.

1.2.2 Mecanismos endócrinos

El SRA participa en la modulación del tono vascular por la liberación de algunos factores vasoactivos [Mehta y Griendling., 2007]. El incremento tanto en los niveles como en el grado de activación de los componentes que integran el SRA se ha asociado con el desarrollo de patologías cardiovasculares como la aterosclerosis [Hammoud y cols., 2007], la diabetes y la hipertensión [Kobori y cols., 2007]. En el SRA la Ang II es sintetizada por acción de la renina, enzima proteolítica que actúa sobre el angiotensinógeno dando lugar a angiotensina I (Ang I), que a su vez se convierte en Ang II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Los efectos generados por la angiotensina II son mediados por los receptores AT_1 y AT_2, además la Ang II induce la secreción de vasopresina y aldosterona, modula la ingesta de

agua y la excreción de Na^+ y H_2O, incrementa la actividad del sistema nervioso simpático y produce vasoconstricción [Kobori y cols., 2007].

1.2.3 Mecanismos intrínsecos

El tono vascular es un término que se utiliza para caracterizar el estado contráctil de un vaso, es un indicador del nivel de activación de las células del endotelio y el MLV. El tono vascular es el resultado de la interacción entre mecanismos vasodilatadores y vasoconstrictores que actúan sobre el vaso sanguíneo como hormonas, neurotransmisores, factores derivados de endotelio y cambios de presión sanguínea.

El principal determinante de la contractilidad del MLV es la concentración de Ca^{2+} libre intracelular. La entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular como su salida desde los depósitos intracelulares promueve el aumento de las concentraciones de Ca^{2+}. La activación de receptores acoplados a proteínas Gq por agonistas contráctiles como la noradrenalina, la serotonina (5-HT), el TXA_2, la Ang II y la endotelina (ET) promueve la activación de la enzima PLC que genera DAG e IP_3 a partir de la hidrolisis de PIP_2. El DAG estimula la PKC, que participa en la sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil, mientras que el IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} desde el RS por activación del receptor IP_3 de la membrana del retículo. Ademas, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaV) que se activan por despolarización de la membrana, así como los canales de Ca^{2+} acoplados a receptores, también van a contribuir al incremento del Ca^{2+} intracelular [Webb, 2003]. Cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan, éste se une a la CaM; el complejo Ca^{2+}-CaM se une a la subunidad catalítica de la MLCK, que se encuentra en forma inactiva, formando así un complejo enzimático (complejo Ca^{2+}-CaM-MLCK) que cataliza la transferencia de grupos fosfato a la cadena ligera de la miosina (MLC20). Esto incrementa la actividad ATPasa de la miosina, la cual interactúa con la actina, induciéndose la contracción muscular [Hirano, 2007] (**Figura 4**).

La activación de los receptores acoplados a proteínas G además de estimular a la enzima PLC, también puede activar la fosfolipasa A_2 (PLA_2) y la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA); también puede activar a las Rho-quinasas y cascadas de

proteínas quinasas activadas por mitógenos las MAPK-Ras. La enzima PKC, Rho-quinasa y MAPK pueden fosforilar directamente la MLC20, incrementando la actividad ATPasa de la miosina.El AA, la PKC y la Rho-quinasa pueden inhibir a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), manteniendo de esa forma la fosforilación de la MLC20 y consecuentemente la contracción [Abdel-Latif, 2001].

En relación al proceso de relajación este tiene lugar cuando disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular, la disminución de la concentración de Ca^{2+} tiene como resultado la eliminación del estímulo contráctil. La disminución de Ca^{2+} se produce por la recaptación del Ca^{2+} intracelular en el retículo sarcoplásmico mediante la Ca^{2+}-ATPasa (SERCA) y por la salida de Ca^{2+} al exterior celular a través de la bomba de Ca^{2+} (PMCA) o del intercambiador Na^{+}-Ca^{2+} de la membrana plasmática. Esta disminución de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular conlleva la disociación del complejo Ca^{2+}-CaM-MLCK, además también la MLC20-P es desfosforilada por la MLCP permitiendo que la miosina vuelva a su estado inactivo, produciéndose de esta manera vasodilatación [Webb, 2003; Hirano, 2007]. Múltiples compuestos van a generar segundos mensajeros intracelulares, como los nucleótidos cíclicos AMPc y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), que promueven el inicio de cascadas de señalización para producir relajación, siendo el AMPc el principal mediador de la relajación inducida por agonistas β_2-adrenérgicos, mientras que el GMPc media la relajación inducida por NO, monóxido de carbono y péptido natriurético [Akata, 2007].

La activación de proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) y dependientes de GMPc (PKG) promueven, entre otros efectos, la reducción de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular por los siguientes mecanismos: 1)Activación de la recaptura de Ca^{2+} por depósitos intracelulares vía fosforilación de la SERCA; 2) incremento de la salida de Ca^{2+} por activación de la PMCA y del intercambiador Na^{+} -$Ca^{2+;}$ 3) inhibición de la salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico vía fosforilación del receptor IP_3 y/o inhibición de su síntesis; 4) activación de canales de K^{+} dependientes de Ca^{2+} en algunos lechos vasculares, lo que produce la hiperpolarización de la membrana celular que conduce a una inhibición

de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular a través de canales de calcio dependientes de voltaje [Akata, 2007].

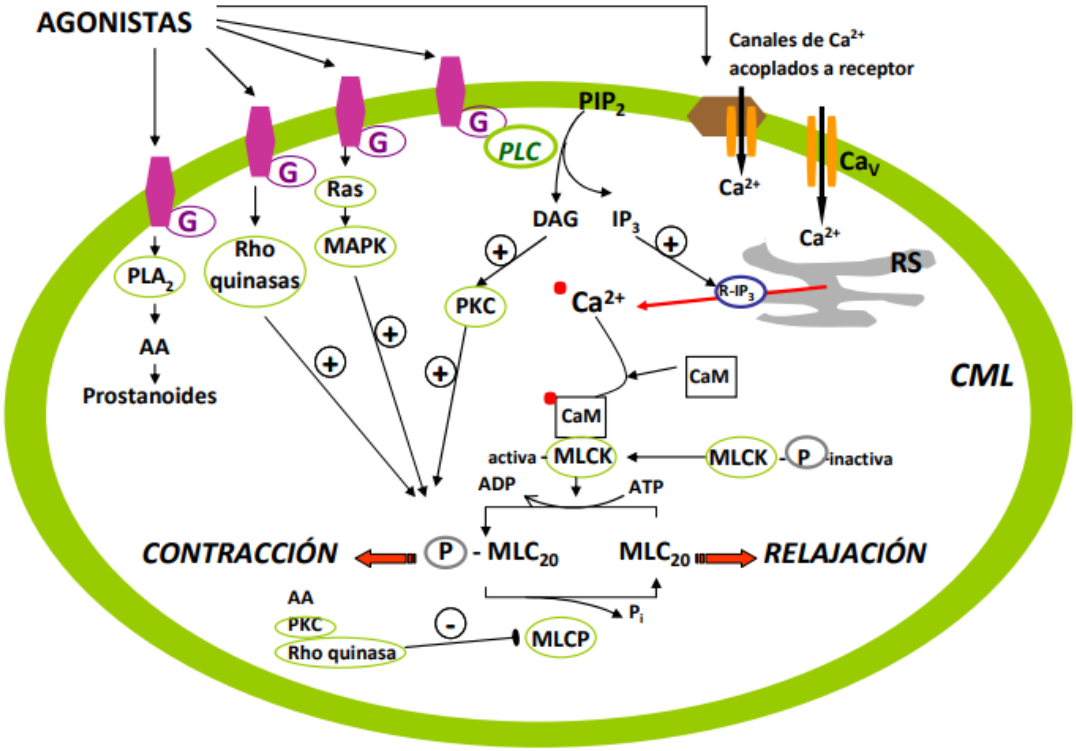


Figura 4. Mecanismos implicados en la contracción y relajación del músculo liso vascular. AA: ácido araquidónico; ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato; CaM: calmodulina; CaV: canales de Ca2+ dependientes de voltaje; CML: célula muscular lisa; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol 1,4,5-trifosfato; MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos; MLC: cadena ligera de la miosina; MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina; MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina; PIP2: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato; PKC: proteína quinasa C; PLA2: fosfolipasa A2; PLC: fosfolipasa C; RS: retículo sarcoplásmico. Adaptado de Abdel-Latif, 2001.

1.2.3.1 Factores endoteliales

En 1980 Furchgott y Zawadski que el endotelio es un regulador de la vasodilatación, demostraron que anillos arteriales pre contraídos se podían relajar en respuesta a acetilcolina, solo sí las células del endotelio estaban intactas, lo cual sugería que la respuesta estaba mediada por alguna sustancia derivada del endotelio, Furchgott propuso en 1986 que era el NO.

1.2.3.1.1. Óxido nítrico (NO)

El NO tiene las siguientes características es un gas inestable, se libera de manera pulsátil, es muy lábil, posee un electrón no pareado y tiene una vida media de aproximadamente seis segundos y es el mas importante mediador de la relajación vascular. La síntesis del NO esta mediada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), enzima encargada de sintetizar NO y L-citrulina a partir de L-arginina para esto se requieren los siguientes cofactores nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NAD(P)H], flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (BH4) y CaM (**Figura 5)** [Mitchel y cols., 2008; Schimidt y cols., 2007]. Cuando existe un déficit de sustrato u oxidación de cofactores como BH4, esta enzima oxido nítrico sintetasa puede generar anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A su vez, la interacción entre NO y O_2^- da lugar a la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$), una especie altamente reactiva [Yoneyama y cols., 2001; Matoba y cols., 2000].

El NO es sintetiado por 3 diferente isoformas de la NOS la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS), la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS)**.** Las isoenzimas, la nNOS y la eNOS se les denomina constitutivas, y ambas responden a los agonistas bradicidina y acetilcolina (ACh) que incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular., estas isoenzimas producen NO por cortos periodos de tiempo. La isoforma inducible (iNOS) se expresa en macrófagos y las células endoteliales en repuesta a procesos inflamatorios y sintetizan más NO que las sintasas constitutivas, produciendo de una manera constante y por largos periodos de tiempo. La síntesis de NO depende también de la unión de la NOS a la CaM, para lo que requieren un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Otro mecanismo fisiológico importante que regula la producción de NO es la fuerza de roce que ejerce el flujo sanguíneo al circular por los vasos. Otra característica del NO es que es liposoluble y atraviesa las membranas celulares, es decir el NO difunde del endotelio a las células del MLV adyacente de esta manera activa a la enzima GSc, provocando un aumento de los niveles celulares de GMPc, que a su vez disminuye la concentración de Ca^{2+} necesario para la interacción de las proteínas contráctiles y esto produce vasodilatación.

La función endotelial se evalua de forma indirecta a través de la determinación de la relajación dependiente de endotelio, esto refiere a la capacidad del endotelio de liberar sustancias vasoactivas que actúan sobre las células del MLV, en respuesta a estímulos como la acetilcolina. Esta actividad se debe a la producción de NO, la producción de NO a nivel endotelial la controla la eNOS, enzima que está sometida a una regulación tanto transcripcional como postranscripcional, la región promotora del gen que codifica para esta enzima contiene desde elementos de respuesta a condiciones de flujo (*shear stress response element*, SSRE), hasta regiones potencialmente mediadoras de regulación por niveles de colesterol, lo que da una idea de la complejidad de su regulación. La disminución de la dilatación dependiente de NO es la manifestación más temprana de la disfunción endotelial, se produce antes de que se aprecien alteraciones morfológicas y es la primera función que mejora con ciertos tratamientos farmacológicos. El efecto antiproliferativo del NO parece estar relacionado con la represión por el NO de la transcripción de genes como la ciclina A, un regulador clave de la transición entre la fase G1 y S de la fase de replicación del ADN del ciclo celular.El NO también regula la integridad del endotelio de forma coordinada con el factor de crecimiento endotelial vascular, por ello el NO es consisderado como el sensor más sensible y específico para evaluar la función endotelial [Förstermann U y Li H, 2011].

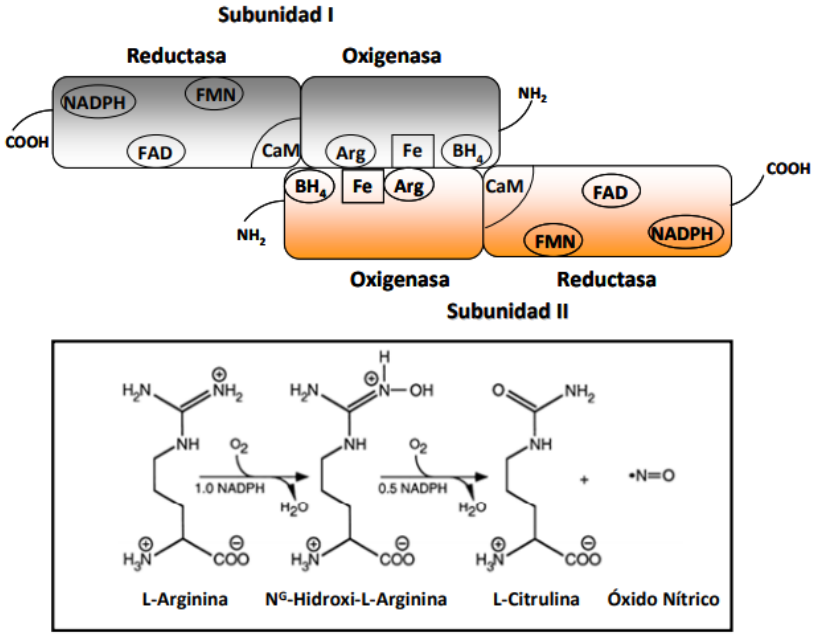


Figura 5. Esquema de la estructura dominio de NOS mostrando los sitios de unión de cofactores y sustrato. En la parte inferior se muestra la reacción de síntesis del óxido nítrico. Arg: arginina; BH4: tetrahidrobiopterina; CaM: calmodulina; FAD: flavín adenín dinucleótido; Fe: ion hierro; FMN: flavín mononucleótido; NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. Adaptado de Andrew y Mayer, 1999.

Por lo tanto, fisiológicamente es fundamental la liberación de NO, el cual mantiene el tono del MLV, regula la distribución del flujo sanguíneo en los lechos vasculares y participa en la regulación de la resistencia periférica contribuyendo, de este modo, al control de la presión arterial. Además, el NO tiene propiedades vasoprotectoras y antiateroscleróticas, ya que inhibe la agregación y adhesión plaquetaria en la pared vascular [Li H y cols., 2000]. En el endotelio, este mediador es sintetizado por acción de la eNOS tanto en condiciones basales como tras ser activada por diversos agonistas o por el rozamiento producido por el flujo sanguíneo. Se ha demostrado que el NO participa en la relajación dependiente de endotelio inducida por bradicinina y ACh en diferentes lechos vasculares [Briones y cols., 2002]. Asimismo, modula las respuestas vasoconstrictoras inducidas por diferentes agonistas, como fenilefrina y noradrenalina [Leung y col., 2006]. Una vez sintetizado, el NO difunde a la capa media donde produce vasodilatación a través de mecanismos, dependientes e independientes de GMPc. Por un lado, el NO activa la guanilato ciclasa soluble (GCs) y la subsiguiente producción de GMPc, principal mecanismo intracelular, por el que el NO produce relajación. Éste activa a la PKG que disparará una serie de reacciones de fosforilación que en última instancia provocan la relajación de las células del MLV como consecuencia de la disminución de Ca^{2+} intracelular y la reducción de la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil. Tambien el NO puede provocar relajación por activar directamente canales de K^{+} a través de la hiperpolarización de la membrana, que conduce a una inhibición de la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (**Figura 6).**

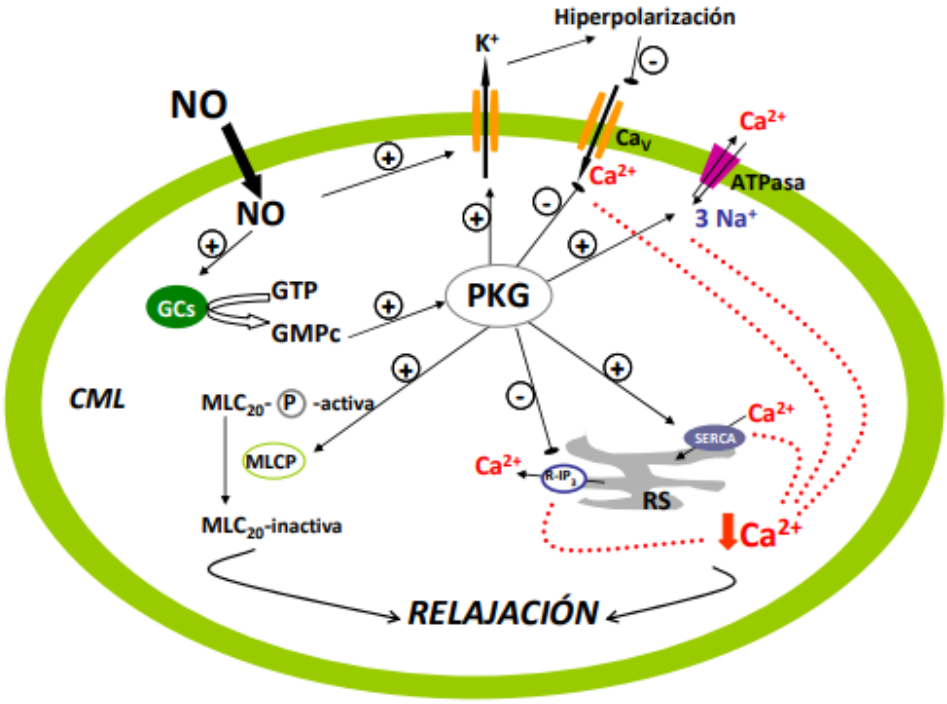


Figura 6. Mecanismos de relajación inducidos por el NO. Cav: canales de Ca^{2+} dependientes de volaje; CML: célula muscular lisa; GCs: guanilato ciclasa soluble; GMPc: guanosín monofosfato cíclico; GTP: guanosín trifosfato; IP3: inositol 1,4,5-trifosfato; MLC20: cadena ligera de la miosina; MLC-P: cadena ligera de la miosina fosforilada; NO: óxido nítrico; PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc; SERCA: Ca2+-ATPasa del retículo sarcoplásmico. Adaptado de Abdel-Latif, 2001.

Por lo tanto, la relajación del MLV se produce ya sea como resultado de la eliminación del estímulo contráctil o por la acción directa de una sustancia que estimula la inhibición del mecanismo contráctil, independientemente el proceso de relajación requiere una disminución de Ca^{2+} intracelular y el aumento de actividad de la MLC fosfatasa. Los mecanismos capaces de secuestrar o eliminar Ca^{2+} intracelular y/o de aumentar la actividad de la MLC fosfatasa contribuye a la capacidad de respuesta anormal de las células del MLV. La disminución en la concentración intracelular de Ca^{2+} provoca la relajación de CMLV, varios mecanismos están implicados en la eliminación de Ca^{2+} citosólico e involucran al RS y a la membrana plasmática. La recaptación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico depende de la hidrólisis de ATP. La membrana plasmática también contiene Ca, Mg ATPasas, proporcionando un mecanismo adicional para reducir la concentración activa de Ca^{2+} en la célula, los intercambiadores Na^{+} /Ca^{2+} ubicados en la membrana

plasmática contribuyen también a la disminución de Ca^{2+} intracelular asi como los canales de Ca^{2+} operados por receptores o por voltaje, son importantes en el influjo de Ca^{2+} y la contracción de CMLV y por lo tanto su inhibición puede provocar relajación.

La inactivación del NO se debe a la reacción NO y el radical superoxido $0_2^{\cdot -}$ que tiene una velocidad tres veces mayor que la velocidad de reacción de la superoxido dismutasa (SOD), enzima que transforma el $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2. La reacción preferencial del $O_2^{\cdot -}$ es con el NO para formar peroxinitrito el cual es un potente oxidante este participa en la oxidación de grupos sulfhidrilos, de lípidos y en la nitración de residuos de tirosina. El peroxinitrito en altas concentraciones es tóxico debido a que modifica la estructura y función de proteínas contribuyendo de esta manera a la disfunción vascular [Combes y cols., 2001; Munzel y cols., 2005]. Debido a la velocidad de reacción, siempre hay $O_2^{\cdot -}$ inactivando NO tanto en las células como en el espacio extracelular **(Figura 7)**. En condiciones fisiológicas las defensas antioxidantes SOD, glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) mantienen el balance entre NO y $O_2^{\cdot -}$**.**

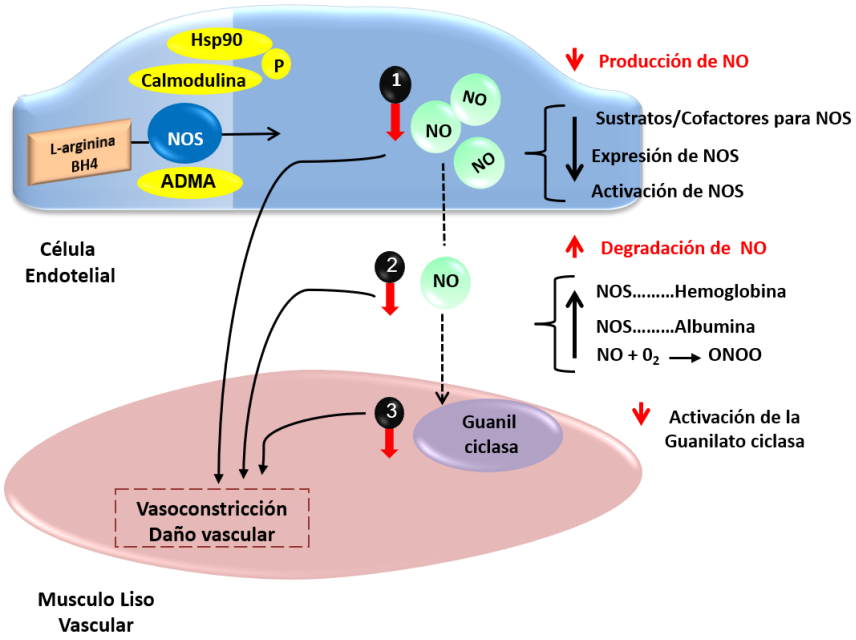


Figura 7. Los mecanismos que llevan a una disminución en la síntesis de NO. Disminución de sustratos, la L-arginina y BH_4, diminución en la expresión y activación de la eNOS, inhibidores de la eNOS, aumento en la degradación de NO debido a un incremento en la unión de NO, con hemoglobina, albumina y superoxido, la cual forma peroxinitrito, todos estos mecanismos disminuyen la activación de la guanilato ciclasa y la producción de NO. Adaptado de Vanhoutte y cols., 2010.

1.2.3.1.2 Prostanglandinas

La enzima PLA_2 libera acido araquironico (AA) a partir de los fosfolípidos de membrana plasmática, una vez liberado el AA es metabolizado por las ciclooxigenasas (COXs), estas enzimas tiene actividad oxigenasa y peroxidasa, por lo tanto, primero se libera prostaglandina G_2 (PGG_2) y posteriormente a la prostanglandina H_2 (PGH_2). La PGH_2 es el sustrato para la sintasa de prostaciclinas la cual libera prostanglandina A_2 ($PGI_{2)}$. Cuando las células endoteliales son estimuladas por agonistas como la ACh se incrementa el Ca^{2+} intracelular, esto origina que se libere NO y PGH_2. El Ca^{2+} es el paso necesario para la activación de la NOS III, la cual estimula la síntesis de NO y PGI_2. La PGI_2 activa los receptores IP sobre el músculo liso, produciendo vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria, estos efectos los realiza en forma sinérgica con el NO [Kawabe y cols., 2010].

1.2.3.1.3 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

La relajación del MLV implica la hiperpolarización de la membrana celular, a través de la propagación de la corriente eléctrica entre las células endoteliales y las células del MLV.

Este tipo de respuesta puede ser inducida por agonistas como bradicinina, la ACh, la histamina o sustancia P. La respuesta mediada por EDHF se inicia por un incrementos en la concentración de Ca^{2+} endotelial y la consecuente activación de los canales de K^{+} activados por Ca^{2+} de pequeñas e intermedias conductancia que hiperpolarizan las células endoteliales [Busse y cols., 2008].

1.2.3.4 Sustancias vasoconstrictoras

1.2.3.4.1 Noradrenalina

La adrenalina y la noradrenalina, hormona y neurotrasmisor respectivamente, son sintetizados a partir de la L-tirosina, por dos fuentes en el organismo: las terminaciones nerviosas simpáticas, que liberan noradrenalina sobre los órganos efectores después de la estimulación, y las células cromafines de la medula suprarrenal, que son las neuronas simpáticas posganglionares y fuentes de síntesis, almacén y liberación de adrenalina y noradrenalina bajo la estimulación de los receptores nicotínicos de acetilcolina. Ambas catecolaminas modulan respuestas fisiológicas como el metabolismo, la vasoconstricción, la vasodilatación, la proliferación y la presión sistólica/diastólica**.** La noradrenalina y la adrenalina que son liberadas en situaciones de estrés, ansiedad y aumento de la presió, estas catecolaminas son mediadas por hormonas como histamina, Ang II y bradicinina.

Los receptores a noradrenalina son receptores metabotrópicos, estos son receptores α y β-adrenérgicos que están acopladoa a proteínas G que activan vías intracelulares que integran y transducen las señales en el endotelio y el MLV, la noradrenalina mediante la unión a sus adrenoreceptores genera repuestas celulares en las que participan proteínas como la PKC, PLC y la AC que activan a segundos mensajeros. De esta maenra se lleva en parte la modulación del tono vascular, las isoformas de los receptores α adrenérgicos que participan son los α_1 y α_2 adrenergicos los cuales son responsables de la regulación del tono vascular e importante en la hipertensión arterial.

1.2.3.4.2 Angiotensina II

La Ang II afecta a todas las células del MLV, endoteliales, fibroblasto, monocitos/ macrófagos por lo tanto es importante en el desarrollo de la función endotelial. El efecto de la Ang II es a través de los receptores AT_1 y AT_2 los cuales se acoplan a proteínas G. En el MLV la Ang II se une a los receptores AT_1 de esta manera activa a la PLA_2 y la fosfolipasa C [Mehta y cols., 2007]. La activación de la PLC produce IP_3 y DAG, el IP_3 al unirse a sus receptores en el retículo endoplasmatico abre los canales de Ca^{2+} y aumenta las concentraciones en el citoplasma, el Ca^{2+} se une a CaM y promueve la interacción de los filamentos de actina y miosina para iniciar la contracción del musculo liso, también el DAG activa la proteína PKC y genera vasoconstricción [Wu y cols., 2002, Mehta y cols., 2007; Watanabe y cols., 2005] **(Figura 8).**

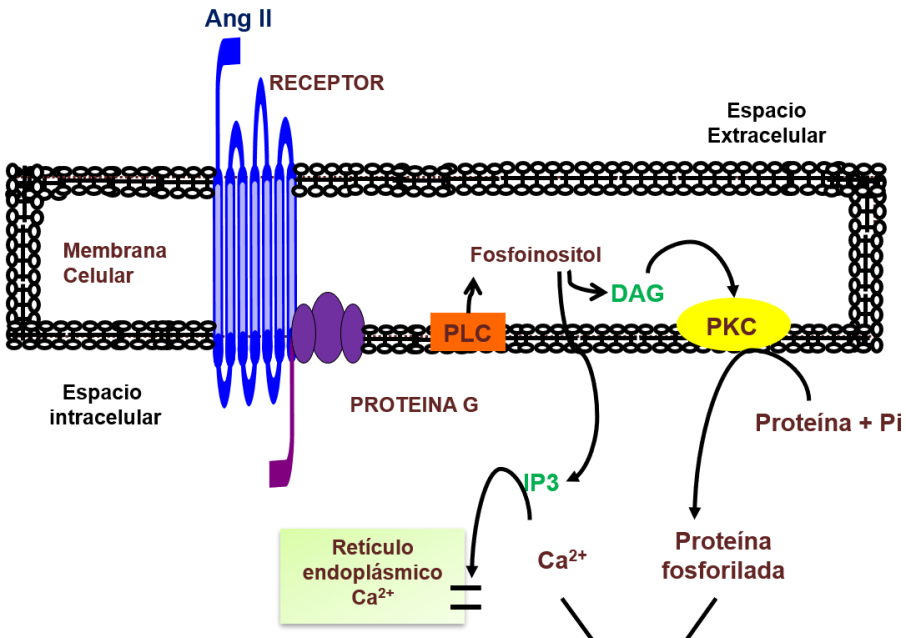


Figura 8. Mecanismo de acción de la Angiotensina II en el musculo liso vacular. Los receptores AT_1 estan acoplados a una proteína G que activa a la PLC, DAG, IP3 e induce vasoconstricción.

1.2.3.4.3 Endotelina

La ET se compone de 3 péptidos vasoactivos, cada uno ET 1, 2, 3 y estructulamnete esta formado por 21 aminoácidos. La ET-1 estan mediadas por 2 subtipos de receptores el ET_A y ET_B que se localizan en el endotelio y en el MLV. En las células endoteliales, la estimulación de los receptores ET_B libera NO y/o PGI_2, lo cual produce vasodilatación. Su

efecto vasoconstrictor e inotrópico positivo se logra a través del incremento del Ca^{2+} en el citosol [Schiffrin, 2005]. Para este efecto, la ET-1 se une a su receptor ET_A localizado en el sarcolema, de la célula del MLV de esta manera activa a la enzima PLC, esta activación induce hidrólisis de los lípidos de inositol localizados en la membrana, formando dos segundos mensajeros, IP_3 y DAG. El IP_3 se une a su receptor en la superficie del retículo sarcoplásmico, de esta manera se genera la liberaciónde Ca^{2+} hacia el citosol. Por otro lado, la vía del DAG activa la PKC, incrementa la sensibilidad del aparato contráctil al Ca^{2+} ésta va a fosforilar a la CLM e inicia la contracción muscular.Tambien la ET-1 a nivel citoplasmático, puede llevar a cabo funciones de activación de la cascada de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), a través de la activación de las MAPK contribuye con el control del crecimiento celular, adhesión y migración en la vasculatura [Marasciulo y cols., 2006; Prasad y cols., 2009].

1.2.3.4.4 Tromboxano A_2

El TXA_2 es un metabolito del ácido araquidónico generado por la acción secuencial de 3 enzimas: PLA_2, COXs (COX-1 o COX-2) y tromboxano sintasa (**Figura 9).** El TXA_2 participa en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares, enfermedad coronaria, infarto agudo al miocardio e hipertensión. La activación de los receptores TP por TXA_2 contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares a través de los siguientes procesos: vasoconstricción, agregación plaquetaria, estrés oxidativo (EO), inflamación, expresión de moléculas de adhesión, contracción y proliferación vascular, respectivamente [Smyth, 2010]. El efecto de la respuesta de los receptores a TXA_2 esta mediada por proteínas G a través de los receptores TP (isoformas α y β), los cuales se expresa en plaquetas (TP α), macrófagos, células endoteliales y células del MLV. Las acciones son agregación plaquetaria. La interacción ligando receptor TP activa diferentes cascadas de señalización que regulan el flujo celular de iones, disposición del citoesqueleto, adhesión celular, motilidad, factores de transcripción nuclear, proliferación, supervivencia celular y apoptosis. Se ha reportado que son activados diferentes efectores y segundos mensajeros rio abajo: IP3, DAG, AMPc, proteínas G pequeñas (Ras, Rho), fosfoinositol-3 quinasa, así como proteína PKC y PKA. Por otra parte, también el TXA_2 al unirse a los receptores TP en el MLV inhibe a canales de Kv, produce despolarización de la membrana celular, activa

a canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, incrementa el Ca^{2+} intracelular y así favorecer la vasoconstricción.

1.2.3.4.5 Serotonina

La 5-HT es un neurotransmisor que participa como mediador químico o neurotransmisor, regula funciones nerviosas, gastrointestinales y cardiovasculares. Las acciones fisiológicas de 5-HT están mediadas por 7 subtipos de receptores ($5\text{-}HT_1$-$5\text{-}HT_7$). Los tipos $5\text{-}HT_{1B}$, $5\text{-}HT_{2A}$ y $5\text{-}HT_{2B}$. El receptor $5HT_{2A,}$ ocasiona vasoconstricción sistémica, mientras el $5HT_{1B}$, provoca vasodilatación en las arterias [Kauman y cols., 2006].

Los receptores $5\text{-}HT_{2A}$ produce vasoconstricción en las células del MLV. Las contracciones inducidas por 5-HT a través de los receptores $5HT_{2A}$ activa a la PLC a través de la proteína Gq para incrementar los niveles citosólicos de IP que favorece la liberación de Ca^{+2} de los sitios de almacenamiento intracelular y causa vasoconstricción. El efecto vasocosntrictor se potencia por el efecto de diversos agentes como la noradrenalina, angiotensina, temperatura o potasio [Hirafuji y cols., 2001].

Las células endoteliales normales responden a la 5-HT potenciando la liberación de NO, con lo que se produce la vasodilatación del músculo liso vascular. Cuando hay una disfunción endotelial, la 5-HT no es capaz de estimular la liberación de NO y aumenta el tono de los músculos lisos vasculares, provocando vasoconstricción. Además, la 5-HT puede actuar como factor de crecimiento y contribuir a la hipertrofia de la capa media favoreciendo la reestructuración vascular [Fanburg y Lee, 1997; Vanhoutte, 1997].

Se ha reportado que la 5-HT aumenta la respuesta contráctil en arterias coronarias en pacientes con enfermedad coronaria y aterosclerosis. Además, se ha reportado que la 5-HT genera disfunción endotelial en arterias ateroscleróticas a través de la participación de dos subtipos de receptores, $5\text{-}HT_{1B}$ y $5\text{-}HT_{2A}$ lo cual se ha asociado con un incremento de las concentraciones en plasma de catecolaminas contribuyendo de esta manera a la remodelación arterial en varias enfermedades vasculares, incluyendo hipertensión y aterosclerosis. En pacientes hipertensos y modelos animales se ha reportado un incremento en la respuesta contráctil a agentes vasoconstrictores en células del MLV. Los agentes

vasoconstrictores reportados son ET-1, la 5-HT y la noradrenalina que se asociaron con la regulación al alza de sus respectivos receptores, ET_A, ET_B, $5\text{-}HT_{2A}$ y receptores α adrenérgicos, respectivamente (Li et al., 2007).

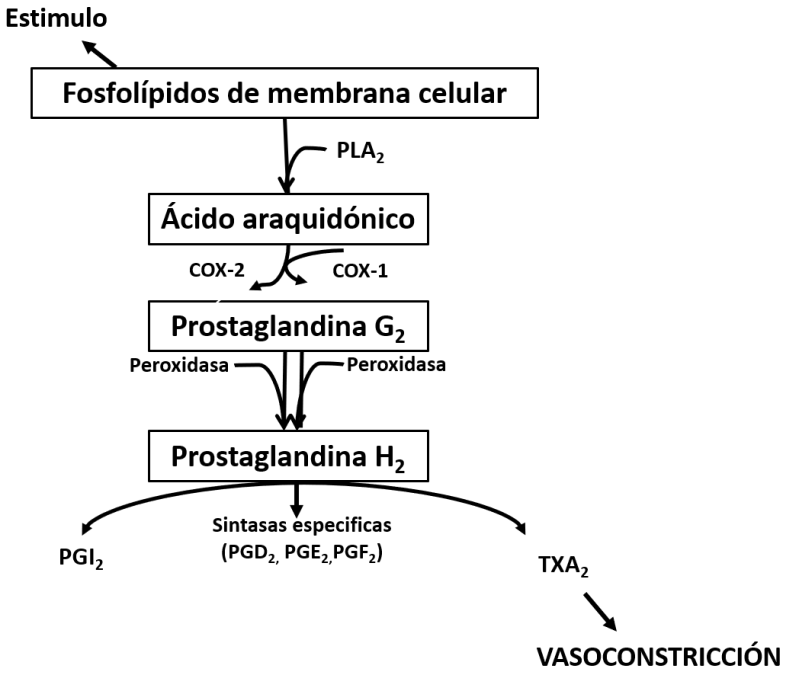


Figura 9. Síntesis del TXA_2. Liberación de ácido araquidónico, de los fosfolípidos de la membrana. La enzima cicloogenasa (COX) transforma el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos (PGG_2 y PGH_2), a partir de los cuales se forma TXA_2 mediante la acción de la enzima tromboxano sintetasa (TXAS). El TXA_2 es un potente vasoconstrictor y el inductor de la agregación de las plaquetas.

1.3 Presión arterial

1.3.1 Factores que determinan la presión arterial

La presión arterial (PA) está determinada por dos factores el gasto cardíaco y la resistencia periférica total, modificación en estos dos factores produce cambios en el nivel de la PA. La regulación de la PA está determinada por la acción del sistema nervioso autónomo y los centros de regulación cardiovascular del sistema nervioso central, los factores vasodilatadores y vasoconstrictores, así como el riñón. Cada uno de estos sistemas actúa diferente en forma y tiempo [Fisiología Humana, 2005].

1.3.1.1 Gasto cardiaco y resistencia periférica

Las arterias pueden sufrir modificaciones estructurales, mecánicas y de función, estas modificaciones podrían contribuir a la elevación de la PA y por lo tanto generar HTA. [Fisiología Humana, 2005].

El GC depende del volumen sistólico y de la frecuencia cardiaca (FC). A su vez, el volumen sistólico varía según la contractilidad cardiaca y el retorno venoso. Por su parte, la RP están regulada por factores nerviosos, factores humorales y locales.

La resistencia vascular sistémica es la resistencia de fricción al flujo de sangre producida por todos los vasos. Entre los distintos segmentos del árbol vascular, los que tienen una importancia relativa mayor son las arterias pequeñas y las arteriolas con diámetros inferiores a 500 μm [Christensen y Mulvany., 2001], su contribución a la resistencia vascular periférica es aproximadamente de un 70%. Según la ley de Poiseuille, la resistencia (R) que ofrece el paso de la sangre a través de un vaso depende de la viscosidad de la sangre (η), de la longitud del vaso (L) y, del radio (r), de acuerdo con la siguiente formula: $R= 8\ \eta L/\pi\ r^4$. Por lo tanto, pequeñas variaciones en la luz del vaso ocasionan cambios relativamente grandes en la resistencia vascular, estos cambios pueden deberse a la contracción y relajación del músculo liso de las paredes, o bien a cambios en la estructura vascular. La característica hemodinámica fundamental de la hipertensión es el aumento persistente de la resistencia vascular [Levy, 2009], que se puede alcanzar a través de diferentes vías., estas pueden generar tanto el engrosamiento estructural de la pared como en la vasoconstricción. Además, la reducción del diámetro de los vasos de resistencia puede ser debido a una alteración funcional por incremento del tono intrínseco vascular, incremento en la carga neurohormonal o por mayor sensibilidad vascular, a una alteración mecánica o a un cambio estructural causando por un remodelado vascular.

1.4 Mecanismos de regulación de la presión arterial

1.4.1 Regulación de la presión arterial a corto plazo

El sistema nervioso autonomo, en especifico el sistema nervioso simpático, tiene un papel importante en el control circulatorio, actuando sobre el tono vascular o por mecanismo de reflejo, el cual responde a baroreceptores aórticos y carotídeos liberando noradrenalina en las terminaciones nerviosas produciendo vasoconstricción y aumento de la FC. El circuito barorreflejo está formado por receptores o transductores, capaces de sensar los cambios de la presión arterial a los cuales se les denomina barorreceptores, estos generan potenciales de acción y envían una señal al sistema nervioso central (vías aferentes).

La vía aferente del reflejo a partir de los barorreceptores del seno carotídeo conecta, a través del nervio glosofaríngeo (IX par craneal), con el núcleo del tracto solitario del bulbo raquídeo, también los barorreceptores aórticos llegan, mediante el nervio vago, a dicho núcleo. A través de las vías eferentes (SNA), se modula la FC y la resistencia periferica (efectores: corazón y arterias) debido a que envían señales hasta el centro vasomotor que, a su vez, a través de los nervios parasimpáticos y simpáticos actúa sobre el corazón y el árbol vascular [Aaronson, 2004]. Por lo tanto, la estimulación de los baroreceptores depende de la magnitud del incremento de presión y de la velocidad del cambio de presión [Kaplan, 2003]. La función de los barorreceptores es estabilizar la presión arterial frente a los cambios bruscos que puede experimentar. Cuando aumenta la presión arterial, los barorreceptores se estimulan y envían potenciales de acción de alta frecuencia al núcleo del tracto solitario del bulbo raquídeo. Las neuronas del núcleo del tracto solitario conectan con el núcleo ambiguo del bulbo raquídeo, responsable del tono vagal del corazón. El tono vagal aumenta y la frecuencia cardíaca disminuye. Por otra parte, las neuronas del núcleo del tracto solitario conectan e inhiben neuronas del bulbo raquídeo responsables de la actividad simpática del corazón y los vasos, en consecuencia, se producen bradicardia, disminución de la contractilidad y vasodilatación. El volumen sistólico, el volumen minuto y las resistencias disminuyen, como la presión arterial depende del volumen minuto y de las resistencias periféricas, el reflejo de los barorreceptores en respuesta a una elevación de la presión arterial tiende a normalizarse [Fisiología Humana, 2005].

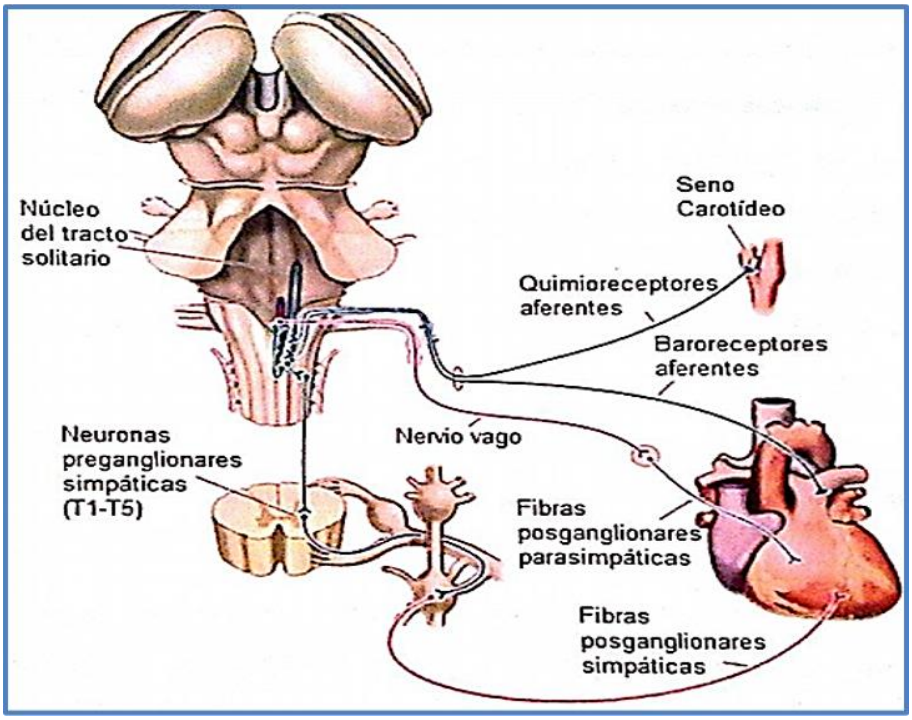


Figura 10. **Regulación de la presión arterial a corto plazo.** El circuito barorreflejo está formado por un grupo de receptores o transductores, capaces de sensar los cambios de la presión arterial (barorreceptores), generar potenciales de acción y enviar esa señal al sistema nervioso central (vías aferentes). Allí se interpreta la señal y, a través de las vías eferentes (SNA), se modula la FC y la RP (efectores: corazón y arterias) debido a que envían señales hasta el centro vasomotor que, a su vez, a través de los nervios parasimpáticos y simpáticos actúa sobre el corazón y el árbol vascular.

1.4.2 Regulación de la presión arterial a mediano y largo plazo

En la regulación de la presión arterial a mediano y largo plazo participa el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) este es un mediador clave de eventos cardiovasculares y progresión de la enfermedad renal, además este sistema regula las resistencias vasculares periféricas a través de los efectos de la angiotensina II y el volumen intravascular indirectamente a través de las acciones tanto de la Ang II como de la aldosterona [Kostenis E y cols., 2005]

Cuando la presión arterial disminuye, los riñones liberan la enzima renina en el torrente sanguíneo, esta enzima modifica el angiotensinógeno, una proteína grande que circula por el torrente sanguíneo, en dos fragmentos, el primer fragmento es la angiotensina I que es relativamente inactiva, esta es dividida a su vez en fragmentos por la enzima convertidora

de la angiotensina (ECA). El segundo fragmento es la Ang II, una hormona activa que provoca la constricción de las paredes musculares de las arteriolas, aumentando la presión arterial. La Ang II interactúa con receptores AT1 de la, en la membrana de las CMLV, desencadenando la vía del fosfatidilinositol, provocando el aumento de los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+}, por vía del inositolfosfato, y la intensificación de la actividad del intercambiador Na^{+}-H^{+} por vía del DAG. Los mecanismos antes mencionados causan una mayor contractilidad del MLV y de la estimulación de la síntesis de proteína, respectivamente. La contractilidad del MLV conduce a una vasoconstricción potente y la mayor síntesis de proteína en la célula muscular vascular, lo que genera una hipertrofia de la pared del vaso dando lugar a un aumento de la resistencia vascular. La angiotensina II también desencadena la liberación de la hormona aldosterona por parte de las glándulas suprarrenales y de la hormona antidiurética por parte de la hipófisis (glándula pituitaria). La aldosterona y la hormona antidiurética provocan la retención de sodio por parte de los riñones, niveles altos de sodio provoca retención de agua y por lo tanto aumenta el volumen de sangre y la presión arterial. La reserva corporal de sodio y líquido extracelular, regulan la presión arterial a largo plazo. De esta manera el SRAA participa en la regulación del balance hidroelectrolítico, volumen plasmático y la resistencia periférica. La angiotensina II, directamente o indirectamente mediante la producción de otros factores vasoconstrictores como catecolaminas y el TXA_2 produce un aumento de la resistencia periféricas y por tanto, de la presión arterial [Crackower y cols., 2002] **(Figura 11).**

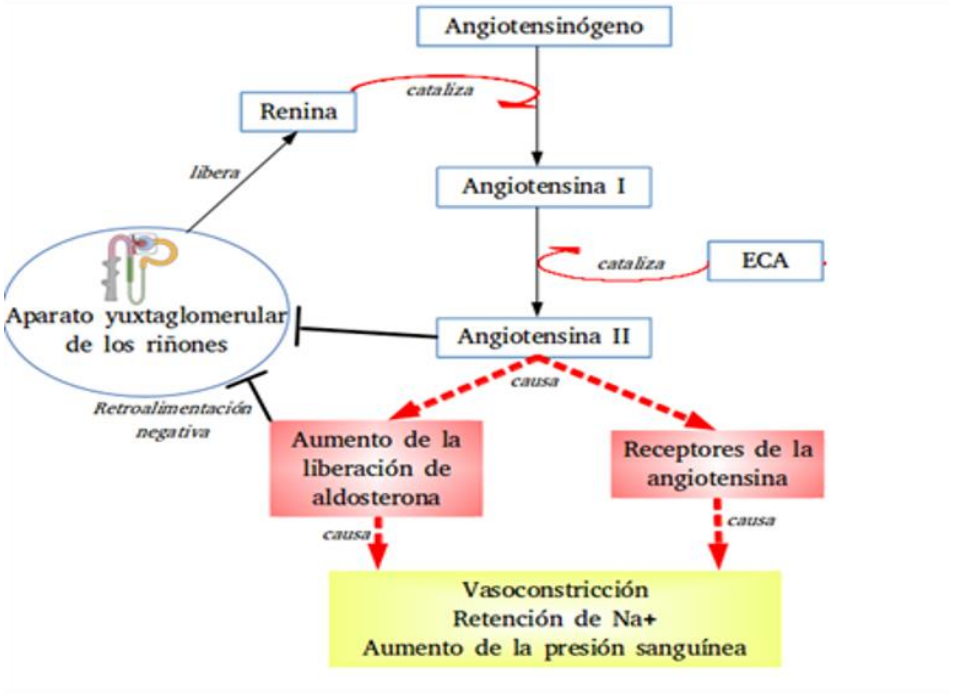


Figura 11. Sistema renina angiotensina aldosterona. Secuencia de reacciones que regulan la la presión arterial. La renina escinde el angiotensinógeno en dos fragmentos, la angiotensina I y angiotensina II. La angiotensina II provoca la constricción de las paredes musculares de las arteriolas, aumentando la presión arterial, también desencadena la liberación de la hormona aldosterona y de la vasopresina. La aldosterona y la vasopresina provocan la retención de sodio por parte de los riñones. El incremento de los niveles de sodio provoca retención de agua, aumentando así el volumen de sangre y la presión arterial.

1.5 Hipertensión arterial

La hipertensión arterial sistémica (HTA) es una patología multifactorial caracterizada por el aumento sostenido de la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD) o ambas, en ausencia de enfermedad cardiovascular renal o diabetes $\geq$140/90 mmHg [NOM-030-SSA2-2009].

De acuerdo a el Séptimo Informe del Joint National Comitée sobre prevención, detección, evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial ha clasificado los valores de la presión arterial en adultos de más de 18 años, que no estén tomando medicación antihipertensiva y que no sufran enfermedades agudas simultáneas a la toma de presión arterial [NOM-030-SSA2-2009; JNC VI] (**Tabla 1**).

CATEGORIA	PAS	PAD
Normal	<120 mmHg	<80 mmHg
Elevada	<120 -129 mmHg	<80 mmHg
HIPERTENSIÓN		
ESTADO 1	130 -139 mmHg	80-89 mmHg
ESTADO 2	≥140 mmHg	≥120 mmHg

Tabla 1. Valores de presión arterial sistémica. Valores correspondientes de presión arterial sistólica (PAS) / presión arterial diastólica (PAD) para adultos mayores.

1.5.1 Epidemiología de la HTA

La HTA es uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y falla renal, que son una de las principales causas de mortalidad en México [Stevens y cols., 2008]. Uno de cada 4 adultos en México padecen HA (25.5%) de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 [ENSANUT 2016]. Para clasificar a un individuo como hipertenso, debe tener una presión arterial mayor a 140/90 mmHg. De acuerdo a la ENSANUT 2016 la hipertensión se presenta ligeramente más en mujeres (26.1%) que en hombres (24.9%). El grupo de edad menos afectado es el de 20 a 29 años, mientras que la prevalencia más alta está en el grupo de 70 a 79 años. Solamente el 60% de la población con hipertensión arterial tiene conocimiento previo de que padece esta enfermedad. De las personas que tienen un conocimiento previo de su condición, 6 de cada 10 (58.7%) controla su presión arterial (<140/90mmHg), y 8 de cada 10 (79.3%) está bajo tratamiento farmacológico. Por lo tanto, se debe promover la detección temprana de hipertensión arterial, especialmente sí se cuentan con otros factores de riesgo para enfermedades no transmisibles [ENSANUT, 2016].

1.5.2 Fisiopatología de la hipertensión

1.5.2.1 Alteraciones vasculares: endotelio y musculo liso vascular

Las propiedades mecánicas de la pared arterial son importantes en la regulación de la presión arterial, su evaluación contribuye al conocimiento de la enfermedad hipertensiva [FISCHER, Cabrera 2004].

Las arterias elásticas o de conducción están adaptadas para amortiguar las variaciones de presión, minimizando el flujo pulsátil del corazón y permitiendo un flujo sanguíneo relativamente constante. Durante la sístole la sangre es impulsada por el ventrículo izquierdo hacia la arteria aorta, proyectándose contra la pared arterial con una gran fuerza. Se ha estimado que, si el tejido de la aorta fuera rígido, la sangre que sale del corazón alcanzaría una velocidad enorme, no sólo en la aorta, sino también en partes más distales del árbol vascular esto provocaría que la sangre iria a hran velocidad desgastando las paredes arteriales y también dañaría los elementos formes de la sangre. Sin embargo, el tejido de la aorta y otras grandes arterias tienen una gran elasticidad debido a la presencia de las laminillas elásticas que forman parte de la pared, estas fibras elásticas participan en la regulación de la PA debido a que almacenan temporalmente la energía producida por la contracción del corazón durante la sístole. Durante la diástole, la liberación de esta energía hace que la aorta regresa a su tamaño original propulsando la sangre contenida. Así, las variaciones de presión en las arterias durante el ciclo cardiaco son de una amplitud relativamente pequeña y distalmente resultan en un flujo continuo [Faury, 2001]. Este flujo continuo puede verse comprometido si se producen alteraciones en las propiedades elásticas de los vasos de conducción. Además, una pérdida de elasticidad en la aorta puede producir una elevación de la presión de salida, contribuyendo al desarrollo de hipertensión arterial. Esta pérdida de elasticidad también está relacionada con la elevación de la presión arterial durante el envejecimiento, en el que se producen fragmentación y calcificación de la elastina y fibrosis vascular por acúmulo de colágeno [Wang y cols., 2010]. Por otro lado, a medida que se endurece la pared, se requiere más energía para mantener el gasto cardíaco y se produce un mayor consumo de oxígeno por el miocardio, lo que conlleva a hipertrofia de la pared del miocardio [Milan y cols., 2011].

1.5.2.2 Remodelado vascular

El remodelado vascular es un proceso adaptativo de la pared vascular que implica cambios estructurales que afectan al crecimiento, proliferación, migración o muerte celular y a la producción o degradación de la matriz extracelular. Este proceso ocurre en respuesta a estímulos mecánicos, hemodinámicos o humorales, provocando cambios en la geometría, composición y función de la pared vascular. A corto plazo, estos cambios contribuyen al control del flujo sanguíneo en los órganos y tejidos pero, a largo plazo, si el estímulo persiste por ejemplo una elevación crónica de la presión arterial resulta en alteraciones patológicas de la pared vascular. Además, este proceso de remodelado vascular también puede aparecer durante la hipertensión.

Las modificaciones estructurales que se generan en el remodelado vascular son alteración del espesor de la pared y del diámetro de la luz y van a ser consecuencia o causa del incremento de la resistencia periférica [Schiffrin y cols., 2005]. Además el remodelado puede ser inducido por la adaptación pasiva a cambios crónicos en factores hemodinámicos y/o a través de factores neurohumorales como Ang II o ERO.

Se puede presentar tres tipos de remodelado vascular: 1) el remodelado hipertrófico, que conlleva un incremento en la cantidad de material del vaso, generalmente de proteínas de matriz como colágeno y fibronectina; 2) el remodelado hipotrófico, que conlleva una disminución de la misma y, 3) el remodelado eutrófico, que implica una reordenación de los distintos componentes de la pared vascular sin cambio en la cantidad de los mismo. Además, el remodelado puede ser hacia el interior del vaso, cuando hay una reducción del diámetro interno del vaso, hacia el exterior, cuando se produce un incremento en el diámetro, o compensado, cuando el diámetro interno no se modifica. En los vasos de resistencia, tanto en hipertensión esencial humana como en ratas SHR, coexisten un remodelado eutrófico es decir un diámetro de la luz vascular disminuido con volumen de pared por unidad de longitud conservada e hipertrófico es decir el diámetro de la luz vascular disminuido con volumen de pared por unidad de longitud aumentada hacia el interior. Este remodelado vascular se debe a un incremento del volumen de la capa media y

del número de capas de células musculares lisas, así como a un aumento en la deposito de proteínas de matriz extracelular [Mulvany y cols., 2008].

El remodelado vascular afecta a todos los tipos de vasos sanguíneos, en términos generales pueden producirse 3 tipos de fenómenos: en las grandes arterias se produce una pérdida de elasticidad, debida a hipertrofia de la pared y a alteraciones en su composición, como consecuencia de la fragmentación y calcificación de las fibras elásticas y a un mayor deposito de colágeno [Lemarié y cols., 2010, Heeneman y cols., 2007]. En las arterias de resistencia se produce estrechamiento de la luz, a veces acompañado de hipertrofia de la pared, por hiperplasia o hipertrofia de las CML, así como por una mayor deposito de colágeno [Mulvany y cols., 2002, Intengan y Schiffrin, 2000].

Así, un aumento de la rigidez del vaso favorece una reducción del diámetro interno afectando a la resistencia periférica. Parece ser que los cambios en la rigidez son fundamentalmente debidos a alteraciones en las fibras de elastina, en el contenido de colágeno, en las proteínas de la matriz extracelular y en las moléculas de adhesión [Briones y cols., 2003]. Además, la actividad de las enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, MMPs, también puede estar disminuida con la hipertensión, lo que conduciría a un aumento de la cantidad de proteínas de matriz [Touyz, 2005].

La disfunción endotelial comprende una pérdida del balance entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores derivados del endotelio, donde el estado vasoconstrictor llega a ser dominante, llevando a cambios patofisiológicos progresivos. Colectivamente, estos cambios endoteliales exhiben características proinflamatorias, prooxidantes, proliferativas, procoagulantes y de adhesión vascular que se considera una de las alteraciones funcionales más importante en hipertensión que favorece el desarrollo de arteriosclerosis. Para que el endotelio pueda ejercer todas sus funciones es necesaria su integridad anatómica y funcional del mismo. La pérdida de la integridad endotelial va a responder a través de la síntesis y liberación de numerosos factores biológicamente activos que van a regular la angiogénesis, las respuestas inflamatorias, la homeostasis, así como el tono y la permeabilidad vascular. Los factores endoteliales que modulan la relajación y la contracción del músculo liso vascular se clasifican en tres grupos: factores relajantes

derivados de endotelio, como la PGI_2, el NO, factores contráctiles derivados de endotelio, como los endoperóxidos, el TXA_2, radicales libres de oxígeno, la Ang II y la ET [Serban y cols., 2010].

En la hipertensión arterial, el endotelio está deteriorado y promueve cambios funcionales de la pared vascular. Por lo tanto, la disfunción endotelial no sólo es un marcador de enfermedad vascular sino que además contribuye a la progresión de la misma. Los pacientes hipertensos tienen deprimida la relajación dependiente de endotelio y este trastorno está asociado a una menor bioactividad del NO. Panza y col., muestran que el aumento de flujo sanguíneo en el antebrazo en respuesta a distintos agonistas que estimulan la producción de NO, como ACh, sustancia P y bradicinina, es significativamente menor en pacientes hipertensos que en normotensos. Además, esta diferencia desaparece cuando ambos grupos son previamente tratados con NG monometil-L-arginina (L-NMMA), un inhibidor de la NOS y también, los hipertensos presentan una respuesta vasodilatadora conservada al nitroprusiato de sodio, donador de NO que actúa directamente sobre el MLV. Estos resultados confirman que en la hipertensión la disfunción endotelial efectivamente está asociada a una menor biodisponibilidad de NO. Más aún, Plavnik y col., 2006 obtuvieron resultados similares en una población sana, sin factores de riesgo, con presión sistólica normal-alta [Plavnik y cols., 2006], y Taddei y cols, lo detectaron en personas normotensas con antecedentes familiares de hipertensión.

Si bien el deterioro de la relajación vascular dependiente de endotelio es un marcador de disfunción, la menor disponibilidad de NO también genera un endotelio con efectos pro-inflamatorios, pro-trombóticos y pro-coagulantes. El deterioro de la relajación dependiente de endotelio en pacientes hipertensos, como mencionamos previamente, puede estar causada por menor síntesis o mayor velocidad de degradación de NO, a lo que pueden sumarse alteraciones en la estructura vascular. Por otra parte, Harrison y cols., demostraron que la hipertensión está asociada a un aumento de la producción de ERO.

Algunos autores han descrito que la disfunción endotelial observada con la hipertensión puede ser debida a la disminución en la producción de NO, o a la disminución de la

actividad de los canales de potasio activados por calcio implicados en la relajación mediada por EDHF. Sin embargo, otros estudios muestran un incremento en la síntesis de NO, probablemente como mecanismo compensatorio frente al incremento de la presión arterial [Briones y cols., 2002; Rossoni y cols., 2002]. A pesar de lo anteriormente mencionado, uno de los mecanismos más aceptados para explicar la disfunción endotelial asociada a la hipertensión es la disminución de la biodisponibilidad del NO, se deba probablemente a un aumento de la generación de $O_2^{\cdot -}$ [Rossoni y cols., 2002].

La disfunción endotelial no es homogénea en sus características y su distribución, varía en función de la patología asociada, así como con el lecho vascular que se considere. La ausencia de la respuesta relajante mediada por NO, se manifiesta también en un aumento de la contracción del MLV en respuesta a diversos vasoconstrictores como, endotelina, la 5-HT y la noradrenalina.

El incremento de la respuesta contráctil se debe a la interacción de vasoconstrictores a sus receptores específicos. La respuesta es el aumento de la actividad de la enzima PLC a través del acoplamiento de una proteína G. En la mayoría de los músculos lisos, la PKC promueve la contracción mediante efectos tales como la fosforilación de canales de Ca^{2+} o de otras proteínas que regulan el ciclo de puentes cruzados. El Ca^{2+} se une a calmodulina, conduciendo a la activación de MLCK, que fosforila la cadena ligera de la miosina. Sin embargo, la elevación en la concentración intracelular de Ca^{2+} es transitoria, aunque la respuesta contráctil se mantiene por un mecanismo Ca^{2+}-sensibilizante provocado por la Rho kinasa a través de la inhibición de la actividad de la fosfatasa de miosina. Este mecanismo se inicia al mismo tiempo que se activa la fosfolipasa C, e implica la activación de la proteína pequeña RhoA de unión a GTP. La activación de RhoA por el receptor acoplado a proteína G tras la activación, RhoA aumenta la actividad Rho kinasa, que conduce a la inhibición de la fosfatasa de miosina. Esto promueve el estado contráctil, ya que la cadena ligera de la miosina no puede ser desfosforilada.

En modelos animales, se ha reportado que la hipertensión genera una disminución de las relajaciones dependientes de endotelio, sin embargo, se han descrito también respuestas

aumentadas y no alteradas, dependiendo del lecho vascular y el modelo de hipertensión estudiado. En modelos animales con hipertensión se ha observado también un incremento en las respuestas contráctiles a diferentes agonistas como 5-HT, noradrenalina. Asimismo, se han descrito alteraciones en la sensibilización de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} e incremento del tono simpático, lo que podrían contribuir al incremento de la resistencia vascular en la hipertensión [Lee y cols., 2004].

1.5.2.3 Otros marcadores de disfunción endotelial

1.5.2.3.1 Estrés oxidativo

Las ERO engloba varias moléculas, que tienen un amplios efectos y funciones celulares. En situaciones fisiológicas existe un equilibrio en la regulación de la producción y eliminación de las ERO; sin embargo, en condiciones patológicas, existe un desequilibrio entre la actividad de las enzimas generadoras de ERO y su degradación, esto genera un incremento de la producción de ERO, provocando un estado de EO [Harrison y cols., 2009]. Dentro del sistema cardiovascular, los efectos de los ERO provocan diferenciación y crecimiento celular, modulación de la producción de la matriz extracelular, inactivación del NO y estimulación de algunas cinasas. Por lo tanto se ha establecido que las ERO participan en el desarrollo de la hipertensión generando alteraciones estructurales y funcionales. [Paravicini y Touyz, 2008].

Se ha reportado que pacientes con hipertensión presentan una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes endógenas a nivel sanguíneo y en células mononucleares indicador de un incremento de EO comparada con individuos normotensos. Las mediciones directas de la producción de ERO en células de mononucleares mostraron que las células aisladas a partir de pacientes hipertensos presentan altos niveles de producción de radicales superoxidos [Rhian M., 2004].

Por otra parte, distintos modelos de hipertensión muestran un aumento del EO asociado tanto a un aumento en la producción vascular de $O_2^{\cdot -}$ [Griendling, 2004; Redón y Oliva, 2003] como a una reducción de la actividad de las principales defensas antioxidantes vasculares de enzimas como la SOD, la GPx, la catalasa y barredores de ERO como

vitamina A, C y E [Polizio y Peña, 2005; Chaves y cols., 2007]. Sin embargo, también existen resultados contrarios, donde un incremento en la expresión de las SODs y GPx en aorta de ratas hipertensas el cual se interpreta como un mecanismo adaptativo para disminuir la elevada producción de radicales [Meng y Roberts, 2002]. El incremento en la producción de ERO, también, se ha asociado con un aumento en la expresión y actividad de enzimas como la XO, NOS o NAD(P)H oxidasa [Hamilton y Brosnan.,2001; Zalba y cols., 2001]. En diversos modelos animales con hipertensión arterial inducida inducida por Ang II, SHR o DOCA-salt entre otros se ha observado que la NAD(P)H oxidasa tiene un papel importante en el desarrollo de la HAS [Beswick y cols., 2001; Griendling,2004]. Además se ha reportado en estos modelos animales con hipertensión un incremento de marcadores de estrés oxidativo como malondialdehído (MDA) e isoprostanos [Donmez y cols., 2002; Alvarez y cols., 2007].El incremento del EO favorece la disfunción endotelial y el aumento de la respuesta contráctil, el EO reduce la biodisponibilidad del NOy genera ONOO- [Bachschmid y cols., 2003; Schildknecht y cols., 2009; Garcíay col., 2000].

La disfunción endotelial es considerado como un predictor temprano de evento cardiovasculares, particularmente en pacientes hipertensos (Zoccali y cosl., 2006), la disfunción endotelial se caracteriza por una reducción en la biodisponibildad de NO y a un incremento del EO (Taddei y cols., 2006). El endotelio en condiciones patológicas puede modificar su fenotipo a través de procesos de vasoconstricción, inflamación y eventos trombóticos, esta respuesta anormal se manifiesta en diferentes estados clínicos tales como hipercolesterolemia, diabetes mellitus e hipertensión, y ocurren en ausencia de cambios morfológicos en la pared vascular. La etiología de estas alteraciones de la función endotelial es multifactorial, y los principales mecanismos a un no han sido totalmente dilucidados. Actualmente, existen evidencias sustanciales que muchas funciones endoteliales son susceptibles a la presencia de ERO y el subsiguiente al EO (Pràtico, 2005). Se ha señalado que el EO puede ser responsable del aumento del tono vascular, aumento de la sensibilidad a agentes vasoconstrictores y a una disminución de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio (Schnackenberg, 2002a; 2002b). En presencia de EO, el anión superóxido ha sido el mas estudiado este actúa neutralizando al NO, al interacccionar con el NO formar peroxinitrito (Pryor y Squadrito, 1995) de esta manera

favorece el efecto vasoconstrictor, por lo tanto la disminución de la biodisponibilidad del NO aumenta el riesgo de disfunción endotelial, aumenta la adhesión y agregación plaquetaria, la quimiotaxis de monocitos y la proliferación de las CMLV, lo que favorece la aparición de la HTA, hipertrofia vascular y enfermedad vascular oclusiva.

La disfunción endotelial es también caracterizada por un cambio fenotípico y un incremento en la adhesividad de las células vasculares, mediante la liberación de moléculas de adhesión como elfactor de von Willembrand (vWF), intercelular-1 (ICAM-1), las moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y las E-selectinas (Nadar et al., 2004). Entre estos, el vWF es probablemente el más extensamente estudiado de estos productos endoteliales, a nivel plasmático las moléculas de adhesión solubles (E-selectinas, ICAM-1, VCAM-1) también mostraron ser elevados en pacientes hipertensos [Parissis y cosl., 2001].

El incremento del EO se debe a una disfunción del sistema de transporte mitocondrial de electrones, la xantina oxidasa, la NAD(P)H oxidasa, la activación de neutrófilos, el metabolismo del ácido araquidónico y la autooxidación de catecolaminas. La importancia biológica de estas especies químicas pueden alterar la estructura de las membranas celulares, producir daño en las proteínas intracelulares, oxidación de las lipoproteínas plasmáticas y aceleración del envejecimiento celular (Rodrigo y Rivera, 2003).

La ERO más común es el anión superóxido, generado en células vivas por la xantina oxidasa, la NAD(P)H oxidasa, el citocromo P450 microsomal y las enzimas mitocondriales de la cadena transportadora de electrones. La autoxidación de la hemoglobina resulta en la generación de $O_2.^-$,también es producido a través de reacciones de algunas moléculas con el oxígeno (adrenalina, dopamina, tetrahidrofolato, citocromos y por células en que ocurre el mecanismo de la fagocitosis como los polimorfonucleares neutrófilos, monocitos, macrófagos) tambie los iones metálicos de los elementos de transición, especialmente cuando se encuentran en el estado reducido, pueden sufrir una autoxidación a la vez que transforman la molécula de oxígeno en O_2^-.

El H_2O_2 aunque no es un radical libre (pero se considera también una de las especies reactivas de oxígeno) puede generar un radical libre extremadamente reactivo, como es al hidroxilo (•OH) en presencia de iones metálicos como Fe^{2+} Cu^{+} ó Mn^{+} a través de la reacción de Fenton. Estos iones al estado reducido también pueden catalizar la reacción entre el H_2O_2y el anión superóxido, conocida como la reacción de HaberWeiss (Rodrigo y Rivera, 2003). Es importante señalar que los iones metálicos de elementos de transición pueden catalizar estas reacciones químicas solamente cuando se encuentran libres. Por lo tanto, una manera de controlar este efecto es a través de la formación de complejos con sustancias quelantes, que por esta vía previenen la formación de radicales libres.

El endotelio es un tejido altamente sensible al daño producido por los radicales libres, afectando a lípidos, proteínas y ADN. El daño puede ser inducido tanto por las ERO o de nitrógeno, como el peroxinitrito. La hipertensión se encuentra asociada con una elevación de las ERO y frecuentemente también con un deterioro de los mecanismos antioxidantes endógenos [Lassègue y Griendling, 2004]. En ratas espontáneamente hipertensas se ha reportado un incremento de ERO en la pared vascular, corazón y riñón, tales como H_2O, O_2^-, y marcadores de oxidación tales como F2-isoprostanos, malondialdehído (MDA) y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico [Lassègue y Griendling, 2004].

1.5.2.3.1.1 Las fuentes de ERO en la pared vascular

Las ERO tienen relevancia debido a su participación en la mayoría de las rutas de señalización intracelular implicadas en el remodelado vascular, los cambios en la reactividad a agentes vasoconstrictores, la hipertrofia de células de la pared del vaso y la inflamación crónica asociada a patologías como la hipertensión. Las ERO son producidas como intermediarios de las reacciones de reducción-oxidación formando H_2O y O_2^- . La secuencia de la reducción univalente de ERO generadas en las células vasculares, el O_2^- y el H_2O_2 son las más importantes. En los sistemas biológicos, el O_2^- es de vida media corta y tras su reducción rápida forma H_2O_2 por la acción de la enzima SOD, de la cual han sido caracterizadas 3 isoformas en mamíferos: cobre/zinc SOD, SOD mitocondrial y SOD extracelular [Gao y Lee., 2001]. El H_2O_2 tiene una vida media más larga que el $O_{2-,}$ es relativamente estable y es fácilmente difusible entre las células. La distintas propiedades

químicas entre O_{2^-} y H_2O_2 y sus diferentes sitios de distribución sugieren que las distintas especies de ERO activan diversas vías de señales, las cuales modulan respuestas biológicas. Todos los tipos de células vasculares producen ERO, incluyendo las endoteliales, CMLV, los fibroblastos, la adventicia, los adipocitos perivasculares y las células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos). Estas ERO pueden ser formadas por varias enzimas, incluyendo la xantina óxido-reductasa, la eNOS, las enzimas respiratorias mitocondriales y la NAD(P)H oxidasa. De estas enzimas las mitocondriales y la NAD(P)H oxidasa parecen ser particularmente importantes en la HAS [García y cols., 2009] **(Figura 12).**

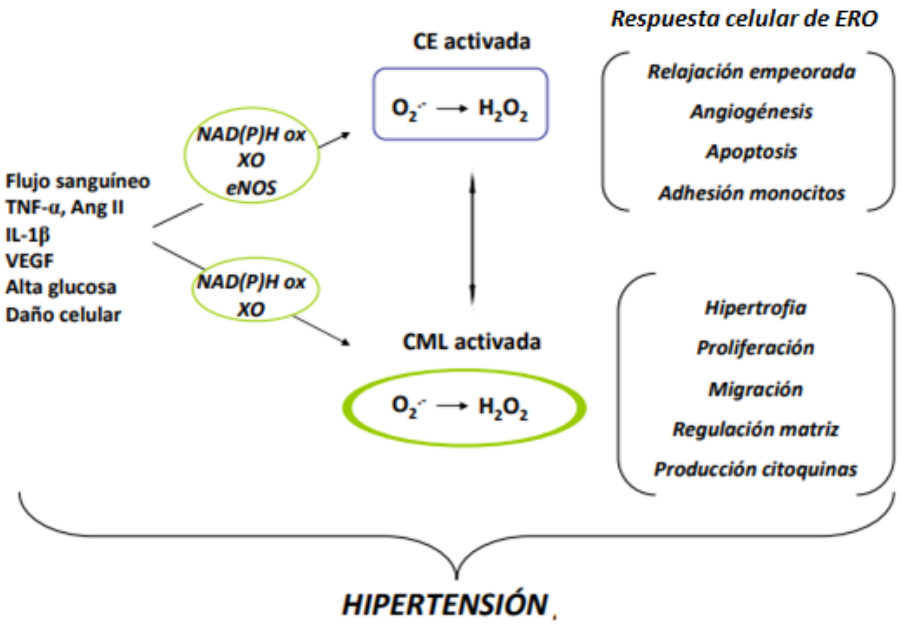


Figura 12. Modulación de la función celular por las ERO durante la hipertensión. Diversos estímulos extracelulares producen ROS que activan las células vasculares, alterando la función celular. Estos cambios en el fenotipo contribuyen al inicio y progreso de enfermedades cardiovasculares. Ang II: angiotensina II; CE: células endoteliales; CML: célula muscular lisa; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; IL-1β: interleuquina-1β; NAD(P)H ox: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; TNF-α: factor de necrosis tumoral-α; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; XO: xantina oxidasa.

La NAD(P)H oxidasa vascular es una enzima constitutiva su activación es regulado por hormonas, cambios metabólicos locales y cambios hemodinámicos. La NAD(P)H oxidasa vascular es sensible a:1) Agonistas de los receptores acoplados a proteínas G como Ang II,

ET-1, 5-HT, trombina, bradicinina y agonistas α-adrenérgicos; 2) factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento transformante β; 3) citoquinas como el factor de necrosis tumoral α, interleucina-1 y el factor de agregación plaquetaria; 4) fuerzas mecánicas como el estiramiento cíclico o el aumento de las fuerzas de rozamiento; 5) isquemia-reperfusión; 6) factores metabólicos como la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y los ácidos grasos libres.

La NAD(P)H oxidasa es la primera fuente de O_2^- en la vasculatura y es funcionalmente activa en todas las capas de la pared vascular: en el endotelio, la capa media y la adventicia. LaNAD(P)H oxidasa se expresa esta formada por diversas subunidades, en las células endoteliales y adventicias están presentes las subunidades p47phox, p67phox, p22phox y gp21phox. La situación es más compleja en células MLV, donde las subunidades p47phox y p22phox parecen expresarse constantemente [Augusto y cols., 2011].

1.5.2.3.1.1.1 NAD(P)H oxidasa y su relación con la hipertensión arterial

A nivel molecular, numerosos factores han sido implicados en la fisiopatología de la HA, entre ellos la activación del SRAA, la inflamación, el receptor de señales acoplado a la proteína G y la disfunción endotelial, común a estos factores encontramos es el EO, que causa producción excesiva de ERO a nivel vascular generando una disminución de la biodisponibilidad de NO y una reducción de la capacidad antioxidante. En el sistema vascular las ERO tienen un papel fisiológico en el control de la función endotelial y el tono vascular, y un rol fisiopatológico relevante en la inflamación, la hipertrofia, la proliferación, la apoptosis, la migración, la fibrosis y la angiogénesis; factores que participan en la remodelación vascular y la disfunción endotelial asociadas a la HAS. En este sentido se ha reportado en pacientes hipertensos un aumento de la producción de ERO así como en modelos animales hipertensos inducida por angiotensina II o aldosterona, o hipertensión inducida genéticamente, por ejemplo, ratas espontáneamente hipertensas (SHR) [Paravicini y cols., 2004].

Dentro de las fuente molecular generadoras de ERO la NAD(P)H oxidasas es la fuente mas importante de ERO en las arterias de resistencia y arterias de conducción. Existen 3 isoformas de la NAD(P)H oxidasa (NOXS) que se expresan en la vasculatura de roedor, NOX1, NOX2, NOX4. Además se ha reportado que la NAD(P)H oxidasa participa en patologías como lahipertensión, se ha reportado un incremento de la subunidad p47phox y p22phox en ratas hipertensas inducidas por Ang II [Paravicini T.M y Touyz RM., 2006].

Por otra parte, se ha reportado que en ratas SHR hay un incremente de O_2^- generados por un incremento de la actividad de la NOX1 y NOX2 isoformas de la NAD(P)H oxidasa en aortas, mientras que la expresión de la proteína NOX4, no se expresa de manera significativa. Además, la alteración de la relajación inducida por ACh de aortas de ratas SHR se mejoró significativamente por VAS2870, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa. Lo que indicaría que la NOX1 y NOX2 pero no la Nox4 participan durante la hipertensión. Es importante destacar que estas isoformas de NOX, en particular, la expresión ectópica de NOX1 en las células endoteliales, parece estar afectada su función vascular de una manera reversible a la NAD(P)H oxidasa, por lo tanto la NAD(P)H oxidasas puede ser una nueva diana para el tratamiento de la HAS [Paravicini T.M y Touyz R.M, 2008].

1.6 Etiología de la hipertensión arterial

Los factores de riesgo para la aparición de hipertensión arterial son la edad, una alta ingesta de sodio, dietas elevadas en grasas saturadas, el tabaquismo, estilo de vida sedentario, la presencia de enfermedades crónicas como obesidad, diabetes, además se han asociado la exposición de metales pesados como el cadmio al incremento de la presión arterial [Navas y cols., 2005: Satarung y Moore., 2004] **(Tabla 2).**

1. Obesidad.
2. Resistencia a la insulina.
3. Ingesta elevada de alcohol.
4. Ingesta elevada de sal en pacientes sensibles a la sal.
5. Edad y Sexo.
6. Sedentarismo.
7. Estrés.
8. Ingesta baja de potasio.
9. Ingesta baja de calcio.
10. Metales pesados

Tabla 2. Factores hipertensinogénicos

1.6.1 Cadmio como factor de riesgo en la hipertensión arterial

La liberación de cadmio al medio ambiente se produce a través de la fundición de otros metales, la quema de combustibles fósiles y materiales de desecho y el uso de fertilizantes con fosfato (IPCS, 1992). La alta concentración de cadmio en el suelo y el suministro de agua es uno de los factores indicativos de su contenido en carne, pescado, vegetales, frutas y tabaco (Horiguchi et al., 2004, Satarug y Moore, 2004). Se ha evidenciado que la exposición crónica de cadmio genera efectos tóxicos, como disfunción renal (Cai et al., 2001), toxicidad hepática (Horiguchi et al., 2000), osteoporosis (Kazantzis, 2004), cáncer de pulmón, riñón y páncreas (Waisberg et al., 2003). Además también se ha reportado que el cadmio genera daños en el corazón y los vasos sanguíneos causando enfermedades cardiovasculares como hipertensión (Varoni y cols., 2003); efecto que ha sido observado en humanos y en modelos animales. [Everett y cols., 2008; Swaddiwudhipong y cols., 2010; Navas-Acien y cols., 2005b; Satarug y Moore, 2004].

De acuerdo a la agencia estadounidense para el Registro de sustancias tóxicas y enfermedades, entre los metales más peligrosos se encuentran el plomo, el mercurio, el arsénico y el cadmio; este último ocupa el lugar número 6 de la lista presentada por esta agencia. La comida y los cigarrillos son las principales fuentes de exposición al cadmio en la población general. Debido a los efectos tóxicos potenciales del cadmio, en el 2009 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria estableció una ingestión semanal tolerable en

los alimentos de 2.5 μg por kg de peso corporal. Al año siguiente, el Comité Mixto de la Organización de Agricultura y Comida de Estados Unidos (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) determinaron un insumo mensual tolerable provisional en los alimentos de 25 μg por kg de peso corporal.

Las manifestaciones clínicas por intoxicación por cadmio, se clasifican de acuerdo con el tiempo de exposición en agudas y crónicas. La clínica de las intoxicaciones por cadmio es variable y sus efectos en la salud dependen de la dosis, la duración y el tipo de exposición, la presencia de otras sustancias químicas, así como de las características y estilo de vida de la persona. En la población en general el cadmio ha sido marcado como responsable de inducir ateroesclerosis, incremento de eventos coronarios agudos y el incremento en la presión sistólica y diastólica. Por otra parte, en adolescentes, los resultados solo muestran una asociación positiva pero no significante entre los niveles sanguíneos de cadmio y algunos factores de riesgo cardio-metabólico como niveles de glucosa, triglicéridos colesterol LDL, enzimas hepáticas y presión diastólica.

Las evidencias clínicas y experimentales indican que el EO favorecido por cadmio es el responsable de su efecto tóxico en las células. El EO produce de manera eficiente la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y por consiguiente aterosclerosis, principalmente en la aorta. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el cadmio genera daño vascular no se han dilucidado del todo.

Se ha reportado en humanos con exposición a cadmio una asociación entre los factores de riesgo cardio-metabolico. Los factores de riesgo cardio-metabolicos que han reportado aumentados son glucosa, triglicéridos, colesterol, LDL, enzimas hepáticas además de un aumento de la presión arterial, factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis (la base de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. Por otra parte también se ha correlacionado los niveles de cadmio en sangre y orina en sujetos por exposición ambiental o por alto índice tabaquismo a hipertensión HAS [Plaza y cols., 1999]. Por lo tanto la exposición a cadmio en humanos se ha asociado a un aumento en la prevalencia de

enfermedades cardiovasculares como la arteriopatías periféricas, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, hipertensión y alteraciones aterogénicas. En un estudio realizado por Shutte en 2009, en personas que residen en áreas con altas y bajas concentraciones de cadmio mostraron problemas femorales, las cuales fueron correlacionadas con altos niveles de cadmio en orina. Además, otros estudios poblacionales de enfermedades cardiovasculares como hipertensión, coronopatias, infarto de miocardio y aterosclerosis se encontró altas concentraciones séricas de cadmio en orina y el cuero cabelludo. En este mismo sentido estudios en pacientes con hipertensión por exposición a cadmio se han correlacionado los incrementos de presión con el incremento de marcadores de lipoperoxidación y una disminución de enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa. Por lo tanto, sé ha propuesto que el cadmio es un factor de riego para la HAS. Sin embargo, los mecanismos biológicos exactos que vinculan la exposición al cadmio y la hipertensión a un no ha sido elucidados.

II ANTECEDENTES

2.1 Cadmio y su asociación a la hipertensión arterial sistémica

Estudios poblacionales han demostrado que la exposición de cadmio ambiental o por alto índice de tabaquismo provoca el desarrollo de hipertensión arterial. El incremento de la presión arterial han sido correlacionados con el incremento de las concentraciones de cadmio a nivel sérico, en orina y en cuero cabelludo de las personas expuestas a este metal [Kuliczkowsk y cols., 2004] [Navas-Acien y cols., 2005; Bhatnagar y cols., 2006]. También se ha demostrado la asociación positiva entre los niveles sanguíneos de cadmio y un incremento de los factores de riesgo cardio-metabólico. Los factores de riesgo cardio-metabólico reportados son un incremento sérico de glucosa, triglicéridos y colesterol, oxidación de LDL, metabolitos de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis, la cual forma parte de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares [Messner y cols., 2009; Brambila y cols., 2011].

Tras la búsqueda del mecanismo por el cual el cadmio induce hipertensión se han estudiado en diferentes modelos animales con hipertensión en los cuales se han utilizado diferentes concentraciones y tiempos de exposición a este metal.

2.2 Efectos del cadmio en la pared vascular

El endotelio vascular es un blanco para la toxicidad del cadmio e induce complicaciones cardiovasculares. Abu-Hayyeh y cols., en un estudio poblacional de sujetos fumadores observaron la exitencia de la acumulación de cadmio en las tres capas de la pared aórtica (íntima, media, adventicia), las concentraciones de cadmio en la capa media fue de 20 µM (en comparación con la concentración séricas de cadmio en un rango nanomolar); este estudio, demostró por primera vez que aparte del hígado, el riñón y los testículos, también la pared vascular es un blanco para la deposición de cadmio [Abu-Hayyeh y cols., 2001].

Sin embargo, no está clara la vía de absorción del cadmio en la pared vascular hasta ahora; se ha reportado varios canales iónicos y transportadores, los cuales son capaces de transportar el cadmio a través de la membrana. En las células endoteliales se expresan transportadores para el cadmio, los ZIP 8 y el transportador 1 de metales divalentes (DMT1), [Erfurt y cols., 2003; Abouhamed y cols., 2007; Wolff y cols., 2008] mecanismos relevantes de la captación de cadmio por las células endoteliales [Carraway y cols., 2006; Gosselet y cols., 2009]. Además, de la absorción directa del cadmio por las células endoteliales de la pared vascular, el metal también puede ser captado por células del sistema inmunológico, y entrar al vaso por infiltración a través de los monocitos/macrófagos generando de esta manera la liberación directa del cadmio en la pared vascular [Abu-Hayyeh y cols., 2001].

Otra ruta de acceso del cadmio a la capa media del vaso es a través de la interrupción de las uniones cadherina-cadherina de las células endoteliales, lo que permite una difusión del cadmio del torrente sanguíneo hacia la capa media, proceso por el cual el cadmio favorece la muerte celular. Por lo anterior descrito, el cadmio genera daños en las células endoteliales dando lugar a la acumulación de este metal en las CMLV. Estudios *in vivo* e *in vitro* de células endoteliales se han reportado que el cadmio genera perdida de la integridad de la barrera endotelial por la disrupción de las uniones célula-célula endotelial, causando la muerte celular [Prozialeck y cols., 2006; Messner y cols., 2009]. Este daño favorecería el aumento de la infiltración de células inmune al endotelio, que permitiría el incremento en la permeacioón y acumulación de lípidos en la pared de los vasos factores que favorecen el

desarrollo de la aterosclerosis, dando lugar a modificación de los perfiles lipídicos, mediante la oxidación de lípidos para la formación de células espumosas y la muerte celular provocada por el aumento de depósitos de lípidos en la pared de los vasos, [Messner y cols., 2009] además de modificaciones en los perfiles lipídicos hacia un estado aterogenico caracterizado por una disminución de lipoproteínas de baja densidad (LDL), liporproteinas de muy baja densidad (VLDL) y liporoteinas de alta densidad (HDL) [Messner y cols., 2009]. Este daño ha sido evidenciado en estudios en animales tratados con cadmio, donde se han evidenciado que la exposición de cadmio genera daños en el corazón y en la pared vascular [Subramanyam y cols., 1992; Messner y cols., 2009], provocando daño endotelial, daño en las células del MLV además de favorecer la formación de trombos en la matriz extracelular promoviendo de esta manera la iniciación y progresión de la aterosclerosis e hipertensión [Eum y cols., 2008; Tellez-Plaza y cols., 2008].

2.3 Estrés oxidativo generado por cadmio

Estudios en mamíferos han demostrado que el cadmio estimula la formación de ERO, a través del aumento de la producción de radicales $O_2^{-\cdot}$, H_2O_2 e OH favoreciendo el EO. El aumento de ERO generado por cadmio genera lipoperoxidación, daño en el ADN, oxidación de las proteínas, alteración de la homeostasis del calcio y alteraciones en la defensa antioxidante enzimática y no enzimática. Estos procesos de daño celular pueden conllevar a generar el desarrollo y la progresión de diversas patologías como: diabetes, osteoporosis, leucemia, cáncer e hipertensión.

El desequilibrio en el balance redox generado por cadmio favorece la presencia de agentes oxidantes y disminuye los antioxidantes, y en consecuencia provoca un incremento en el EO. El grado de EO que induce el cadmio depende de la concentración, tiempo y tipo de exposición. El incremento del EO podría deberse a los siguientes eventos: un desplazamiento de metales redox activos, disminución de atrapadores de radicales libres (escavenger), inhibición de enzimas antioxidantes (catalasa, superoxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa) e inhibición de la cadena transportadora de electrones [Ambily y cols., 2013].

Informes previos sugieren que el cadmio puede causar un incremento de las ERO a través de alteraciones en la defensa antioxidante enzimática y no enzimática [Pathak y Khandelwal, 2007]. El mecanismo propuesto es la unión del cadmio a grupos sulfidrilos de las proteínas dando lugar a un agotamiento de biomoléculas que contienen este grupo funcional

Además, el cadmio disminuye los sistemas de defensa antioxidante de las células al reducir los niveles de glutatión (GSH), así como, interferir con algunos metales esenciales y necesarios para la actividad de enzimas antioxidantes como la Cu/Zn-SOD o Mn-SOD. La producción de ERO también puede estar asociada con la toxicidad del cadmio al aumentar la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (MDA y 4-HDA) [Zuster-Ciesielska, y cols., 2000]. Así mismo, se ha demostrado que el cadmio disminuye las principales enzimas depuradoras del O_2^- intracelulares (SOD, peroxidasa y catalasa) en ratas a diferentes dosis y administraciones de cadmio [Hussain y col., 1987].

Por otra parte, el cadmio también puede aumentar el EO debido a que puede remplazar al Fe^{2+} (un metal con actividad redox), en las células, e inducir la reacción de Fenton favoreciendo la formación de radicales hidroxilo dando lugar al proceso de lipoperoxidación. La lipoperoxidacion es una de las principales manifestaciones del daño oxidativo y se ha indicado que desempeña un papel importante en la toxicidad de muchos xenobióticos inclusive el cadmio. Evidencias se ha reportado que la intoxicación crónica con cadmio causa lipoperoxidación en numerosos tejidos tanto *in vivo* como *in vitro* [Ognjanovi y cols., 2003; Rikans y Yamano, 2000; Tandon y cols., 2003], al generar un incremento de radicales $^{\cdot}OH$, O_2^- y H_2O_2 (O'brien y Salasinski, 1998), e inducir el agotamiento del GSH celular [Obianime y Roberts, 2009; Samarghandian y cols., 2015].

El cadmio también pueden unirse a grupos sulfhidrilo (–SH) y afectar numerosas enzimas alterando procesos metabólicos, incluyendo el metabolismo lipídico [Houston y cols., 2007 32]. Se ha reportado que el cadmio modifica la actividad de la HMG-CoA reductasa, reduce la expresión del gen del receptor de LDL, favoreciendo los niveles plasmáticos de colesterol y el desarrollo de células espumosas [Esterbauer y cols., 1992]. Estos datos

sugieren que la exposición de cadmio podría inducir un aumento de la placa aterosclerótica, favoreciendo la disfunción endotelial.

Por lo tanto, el EO inducido por cadmio podría ser una de las razones de los efectos cardiovasculares, ya que la modificación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por el daño oxidativo, evento clave en el desarrollo de aterosclerosis y oxidación de LDL que promueven las lesiones ateroscleróticas. En un modelo experimental de ratas Buffalo macho que recibieron 50 o 200 ppm de cadmio en el agua de bebida mostraron un aumento en los peróxidos de lípidos y GSH. También aumentó la presión arterial y disminución de la respuesta vascular a agentes vasoactivos. Donpunha y cols., demostraron la presencia de EO en la hipertensión inducida por cadmio y la disfunción vascular, cuando se suministró una dosis subcrónica de Cd (100 mg $CdCl_2$/L en agua de bebida) a ratones ICR macho durante 8 semanas. El daño oxidativo se alivió mediante la suplementación con ácido ascórbico (50 o 100 mg / kg de peso corporal), posiblemente al suprimir la formación de ERO y mantener la acumulación de GSH y, por lo tanto, el equilibrio redox. Las bajas concentraciones de $ZnCl_2$ (10 μM) también podrían inhibir significativamente la producción de ERO inducida por cadmio y la apoptosis causada por la exposición de células endoteliales bovinas, a $CdCl_2$ 0.1–100 μM durante 24 h.

En este mismo sentido pero en un modelo de rata, la administración crónica de cadmio (15 ppm por 2 meses), encontraron un incremento de MDA indicador de la presencia de lipoperoxidación, la cual fue asociada a un incremento del EO generada por este metal. El proceso de la lipoperoxidación ha sido asociado a daño vascular. En este sentido estudios clínicos han asociado a la aterosclerosis con la presencia de lipoperoxidación y un aumento y/o disminución de la actividad de enzimas antioxidantes [Fabbi y cols., 2004; Ognjanovic y cols., 2008; Sinha y cols., 2008]. Datos que han sido evidenciados en este mismo modelo al observar un aumento en la actividad enzimática de la SOD, la GPx y CAT, primera línea de defensa en contra de los radicales $O_2^{-\cdot}$ y H_2O_2. Y correlacionados además por un incremento del ARNm sugiriendo una modulación post-transcripcional y post-traduccional por el cadmio [Skoczynska y Stojek, 2005].

2.4 Disfunción endotelial generada por cadmio

Evidencias en modelos animales han reportado que la acumulación de cadmio en la pared vascular; genera daño endotelial el cual podría ser un proceso importante para el desarrollo de la hipertensión arterial inducida por cadmio.

En un estudio in vitro se ha observado que la exposición de células endoteliales a cadmio (15 mM) genera un incremento en la permeabilidad, inhibición en la proliferación e induce muerte celular [Messner y cols., 2009]. Además Yoopan y cols., 2008 demostraron que la exposición crónica a cadmio (50-1000 ppm) induce disfunción endotelial caracterizada por la disminución de la respuesta relajante a ACh en anillos aórticos. Este efecto, no modificó la vía de señalización del NO, ya que la respuesta a nitroprusiato de sodio un donador de NO, no modifica la respuesta a ACh. En este mismo sentido en ratas hipertensas, el daño endotelial inducido por cadmio (1 mg/kg/15días) se ha asociado con un aumento del EO. Este hecho es de gran relevancia ya que el EO produce oxidación de manera eficiente de lipoproteínas de baja densidad y en consecuencia aterosclerosis. También se ha reportado en un estudio in vitro de anillos de aorta de rata con administración aguda (2 mg/kg/im/8 hr) de cadmio, presentan una hiperrespuesta al agonista adrenérgico fenilefrina. El incremento en la respuesta contráctil es abatido por la incubación de SOD y apocinina (Apo). Por lo tanto se ha propuesto que el cadmio induce hipertensión en ratas, por un incremento en el EO y a una supresión de la expresión de la eNOS en vasos sanguíneos, dañando la vasorelajacion inducida por ACh [Donpunha y cols., 2011].

En este mismo sentido pero en un modelo animal, la administración crónica de cadmio a una concentración de 100 mg/kg, se observó en los anillos de aorta de los animales tratados con cadmio presentan un incremento en la respuesta contráctil a fenilefrina, además la administración de Apo un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa revierte el efecto. Este resultado se correlacionó con el incremento de la expresión de la proteína gp^{91phox}, subunidad de la NAD(P)H oxidasa [Almenara y cols., 2013].

Datos similares son reportados en un modelo de ratones ApoE-/- un modelo de ratón deficiente en apolipoproteína E, un modelo traslacional para el estudio de la aterosclerosis

donde la administración de cadmio (100 mg/L) durante 28 días se evidenció una reducción de la biodisponibilidad de NO en anillos aislados de aorta, lo que se correlacionó con el aumento del EO encontrado después de la exposición a cadmio. Por otro lado, se demostró una sobreexpresión de eNOS en anillos de ratas tratadas con cadmio mecanismo compensatorio en respuesta al aumento de ROS lo que conllevaría a disminuir la biodisponibilidad del NO [Almenara y cols., 2013].

En este mismo sentido, se ha reportado que en patologías como la aterosclerosis, infarto al miocardio, cardiopatía coronaria e hipertensión, una menor biodisponibilidad del NO, la cual se ha asociado a un aumento del EO [Wolf y cols., 2017; Harja y cols., 2008]. Se ha propuesto que el NO al interactuar con el anión superóxido genera peroxinitrito dando lugar así a una disminución de la biodisponibilidad del NO y por lo tanto des favorecer la relajación del MLV. El aumento de la producción de peroxinitrito, puede inducir la iniciación y sostenimiento del desarrollo de la oxidación lipídica, especialmente LDL, lo que resulta en la formación de células espumosas y de esta manera promover la aterosclerosis [Trostchansky y cols., 2001].

2.5 Participación de agentes vasoconstrictores durante la hipertensión arterial generada por cadmio

Los mecanismos por el cual el cadmio genera un aumento de la presión arterial a un están en estudio; sin embargo, se sabe que los cambios en la funcionalidad y/o expresión de los receptor vasculares y la vasoconstricción tienen un papel importantes en el desarrollo de la hipertensión.

Se ha reportado una hiperrespuesta a agentes contráctiles en las células del MLV durante la hipertensión. Angeli, J.K y cols., 2013 en un modelo in vitro, encontraron que la incubación de anillos de aorta con 10 µm de cadmio induce un incremento de la respuesta contráctil a fenilefrina. Este resultado fue asociado a una alteración de la función endotelial posiblemente como resultado de la reducción de la viabilidad del NO por un incremento en las ERO. En este mismo modelo observaron la reversión del incremento de la respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de SOD y Apo. Datos que evidencian que durante la

exposición aguda a cadmio genera en arterias de conductancia disfunción endotelial mediante el aumento de la respuesta contráctil a fenilefrina, por un aumento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa lo que daría lugar a plantear que el incremento de los radicales superóxido generados por las NAD(P)H oxidasa provoca que disminuya la biodisponibilidad de NO a nivel vascular característico de la presencia de disfunción endotelial generada por este metal.

En este sentido pero en un modelo animal con exposición crónica de cadmio (100 mg/L de cadmio) a un tiempo de exposición de 4 semanas, observaron que el cadmio induce un incremento en la presión arterial sistólica. El incremento de la presión arterial sistólica lo asocian con la presencia de disfunción endotelial generada por este metal, este dato lo evidencian a través de la realización de ensayos de reactividad vascular en anillos de aorta donde observaron que el cadmio genera esta disfunción endotelial, a través de un aumento de la respuesta contráctil a fenilefrina y a una disminución del efecto relajante a ACh. La disfunción endotelial generada por cadmio se asoció con un incremento del EO inducido por la NAD(P)H oxidasa que favorece la producción de aniones su peróxidos dando lugar a una menor biodisponibilidad de NO este mecanismo propuesto lo evidenciaron al observar un incremento de la expresión de la NAD(P)H oxidasa en aorta de ratas con hipertensión inducida por cadmio [Almera y cols. 2013].

III. JUSTIFICACIÓN

Estudios epidemiológicos ha demostrado que la exposición a cadmio es un factor de riesgo para inducir ECV (Garner y Levallois., 2017; Grau-Perez y cols., 2017; Wu y cols., 2018), entre las cuales se encuentra la hipertensión arterial sistémica (Messner B. y Bernhard D., 2010; Tellez-Plaza y cols., 2012; Cosselman y cols., 2015; Franceschini y cols., 2017; Garner y Levallois., 2017). Además, también se ha demostrado una asociación positiva entre los niveles sanguíneos de cadmio y el incremento de algunos factores de riesgo cardio-metábolico como la glucosa, triglicéridos, colesterol, oxidación de LDL, dando lugar a aterosclerosis [Messner y cols., 2009; Brambila y cols., 2011, Treviño y cols., 2015; Sarmiento V. y cols., 2017].

Tras la búsqueda del mecanismo por el cual el cadmio induce hipertensión, se han estudiado diversas concentraciones y tiempos de exposición. La administración de cadmio en rata (120 mg/i.v) se observó un aumento del EO (Gilson y cols., 2015). En este mismo sentido la administración intravenosa de 0.1, 0.32, 1.0 mg/kg produjo una respuesta hipertensiva dependiente de la dosis. El efecto hipertensivo máximo se observó dentro de los 15 minutos posteriores a la administración de cadmio. Esta respuesta disminuyó gradualmente durante el período de observación de 1 h. La dosis más baja de cadmio (0.1 mg/kg i.v.) no genero cambios en las concentraciones de MDA en suero. Sin embargo, las dosis medias (0.32 mg/kg i.v.) y altas (1.0 mg/kg i.v.) elevaron significativamente los niveles séricos de MDA (Puri y cols., 2003). Desafortunadamente Ozturk y cols., 2009 observaron que la administración aguda de cadmio 15 mg de Cd^{+2}/kg (2 días) no genera cambios en el sistema hemodinámico del sistema cardiovascular, ni cambios en la actividad de enzimas antioxidantes generando la incertidumbre sobre los resultados con los modelos de intoxicación aguda.

En modelos de exposición crónica a cadmio los resultados son más coincidentes. Yoopan y cols., 2006 reportaron que la administración por 3 meses de cadmio (50 ppm) en el agua de bebida aumentó la presión arterial en aproximadamente un 20-30%. Por otra parte la exposición crónica de cadmio (100 mg/L de cadmio) en un modelo de ratón y rata a un tiempo de exposición de 4 semanas, el cadmio induce un incremento en la presión arterial sistólica, disfunción endotelial y un incremento del EO inducido por la NAD(P)H oxidasa

(Almenara y cols., 2013; Kukongviriyapan y cols., 2004). También se ha observado que la administración crónica de cadmio (2/kg/día) por 60 días observaron un aumento en el volumen sistólico, gasto cardíaco y de la actividad de las enzimas antioxidantes (Ozturk y cols., 2009).

Varias evidencias indican que el endotelio vascular puede ser uno de los objetivos principales de toxicidad por cadmio. Abu-Hayyeh y cols., 2001 encontraron en un estudio poblacional de sujetos fumadores la acumulación de cadmio en las tres capas de la pared aórtica (íntima, media, adventicia). También se ha observado que el cadmio promueve la proliferación de células vasculares del músculo liso y aumenta la producción de componentes de la matriz extracelular que aumentan la rigidez de los vasos sanguíneos (Abraham y cols., 2000; Fujiwara y cols., 1998; Jeong y cols., 2000; Kaji, 2004). También se ha propuesto que el cadmio disminuye la disponibilidad funcional del NO, muy probablemente a través de mecanismos directos o indirectos que involucran EO (Bilgen y cols., 2003; Kishimoto y cols., 1994; Skoczynska y Martynowicz, 2005; Vaziri, 2002).

Con respecto a los estudios de reactividad vascular Jhuli y cols., 2013 encontraron que la incubación de anillos de aorta con 10 µm de cadmio induce un incremento de la respuesta contráctil a fenilefrina. Este resultado fue asociado a una alteración de la función endotelial posiblemente como resultado de la reducción de la viabilidad del NO por un incremento en las ERO. Estudios en tejidos aislados han mostrado que la exposición crónica a cadmio disminuye la respuesta de relajación a acetilcolina en anillos aórticos de rata, pero sin alterar la respuesta a nitroprusiato de sodio, lo que implica una disfunción endotelial por la exposición al xenobiotico (Yoopan y cols., 2008). Varios autores han demostrado que la disfunción endotelial inducida por cadmio probablemente se debe a un desbalance en el EO en el sistema cardiovascular que contribuye al incremento del tono de la pared vascular (Donpunha y cols., 2011; Tzotzes y cols., 2007; Angely y cols., 2013). Datos similares son reportados en un modelo de ratones ApoE -/- un modelo de ratón deficiente en apolipoproteína E, un modelo traslacional para el estudio de la aterosclerosis donde la administración de cadmio (100 mg/L) durante 28 días se evidenció una reducción de la biodisponibilidad de NO en anillos aislados de aorta, lo que se correlacionó con el aumento del EO encontrado después de la exposición a cadmio (Oliveira y cols., 2019). Por otra parte Almera y cols., 2013 mostraron que la exposición crónica de cadmio (100 mg/L de

cadmio) a un tiempo de exposición de 4 semanas, el cadmio induce un incremento en la presión arterial sistólica. El incremento de la presión arterial sistólica se asoció con la presencia de disfunción endotelial a través de un aumento de la respuesta contráctil a fenilefrina y a una disminución del efecto relajante a ACh.

Los datos reportados hasta el momento vincula que el incremento del EO es el responsable de la presencia de disfunción endotelial y que este es el mecanismo por el cual el cadmio genera HAS. Se conoce que la NADPH oxidasa es la fuente principal de EO en el sistema cardiovascular y como se ha mencionado anteriormente ha asociado a patologías cardiovasculares como hipertensión pulmonar e hipertensión arterial sistémica (Lopez y cols., 2001; Paravicini y cols., 2008). En este sentido diversos modelos de hipertensión inducida por cadmio han observado que este metal genera disfunción endotelial caracterizada por una disminución de la relajación evocada por acetilcolina y un aumento de la respuesta contráctil a fenilefrina, por un aumento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa lo que daría lugar a plantear que el incremento de los radicales superóxido generados por las NAD(P)H oxidasa provoca que disminuya la biodisponibilidad de NO a nivel vascular característico de la presencia de disfunción endotelial generada por este metal. Además se ha observado que la incubación de anillo aórticos con APO un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa mejora la disfunción endotelial a través de una recuperación en la relajación evocada por acetilcolina y una disminución en el incremento de la respuesta contráctil a fenilefrina (Tzotzes y cols., 2007; Donpunha y cols., 2011; Jhuli y cols., 2013; Almera y cols., 2013).

Chukwuemeka y cols., 2013 evaluaron el efecto protector de la Apo en la hipertensión inducida por cadmio, usando un modelo de rata al cual administraron 50 y 100 mg/Kg de peso de apocinina y 100 ppm de $CdCl_2$ en su agua de bebida, respectivamente, durante 8 semanas, observaron que la APO fue eficaz en la reducción de la presión arterial inducida por este metal. Este trabajo es el único que ha intentado evaluar el efecto beneficioso de la APO en animales con intoxicación crónica de cadmio. Desafortunadamente el modelo presenta algunos inconvenientes para definir conclusiones. La primera es que los animales

no presentaron un aumento sostenido de presión arterial con el cadmio y segundo que la apocinina genera un efecto hipotensor en los controles.

Por lo anteriormente expuesto observamos que:

A) No hay un consenso sobre el incremento de la presión arterial inducida por cadmio en modelos agudos y su vinculación con la función endotelial.
B) No se ha evaluado la participación en la función endotelial de agonistas contráctiles como la 5-HT y de Tromboxano A_2, que participan en la vasoconstricción de la pared vascular en otros modelos de hipertensión.
C) No se ha evaluado ampliamente el efecto beneficioso de la Apocinina sobre la hipertensión inducida por la exposición crónica de cadmio.

Por lo anteriormente expuesto decidimos diseñar protocolos experimentales que colaboren con las respuestas científicas de las preguntas mencionadas.

A) Evaluar la función endotelial y los posibles cambios en la presión arterial sistémica en dos modelos de intoxicación por cadmio.
B) Evaluar el efecto vasocontráctil de la 5-HT y de un análogo del Tromboxano A_2, que nos permita evaluar su participación en la función endotelial en los dos modelos de intoxicación por cadmio.
C) Evaluar el tratamiento con apocinina en la función endotelial y la hipertensión arterial de ratas con intoxicación crónica de Cadmio.

IV. HIPOTESIS

La NAD(P)H oxidasa participa en la inducción de la disfunción endotelial de la pared vascular de las ratas con hipertensión arterial sistémica inducida por cadmio.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Valorar la función endotelial de ratas con hipertensión arterial inducida por cadmio en presencia de un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la función endotelial de ratas con hipertensión arterial inducida por cadmio a través de curvas dosis respuesta a ACh, fenilefrina, 5-HT y TXA_2.
2. Evaluar el estrés oxidativo de la aorta de la pared vascular con hipertensión arterial inducida por cadmio.
3. Evaluar la función endotelial bajo la inhibición de la NAD(P)H oxidasa de ratas con hipertensión arterial sistémica inducida por cadmio**.**

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratas macho wistar de 2 meses de edad (200-250 g) proporcionadas por el bioterio "Claude Bernard" de la BUAP. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las normas institucionales para el trato ético de los animales de la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999. Los protocolos fueron aprobados por el CICUAL.

6.2 Modelos experimentales

6.2.1 Modelo agudo

Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en los siguientes grupos: grupo Cd^{2+} al cual se le administró vía intraperitoneal 0.25 ppm de $ClCd_2$. Además, también se incluyó el grupo Ctrl al cual se le dió agua *ad libium.*

6.2.2 Modelo crónico

Para otra serie de experimentos los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en los siguientes grupos: grupo Cd^{2+} (40 ppm) y el grupo Cd^{2+} (80 ppm), a los cuales se les administró $ClCd_2$ en el agua de bebida durante 8 semanas en las concentraciones respectivas. Además también se incluyó el grupo Ctrl al cual se le dió agua *ad libitum.*

6.2.3 Modelo administración in vivo de Apo

Para otra serie de experimentos los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en los siguientes grupos: el grupo Cd^{2+} (80 ppm) al cual se les administró $ClCd_2$ en el agua de bebida, el grupo Cd^{2+}-Apo (80 ppm) al cual se le administró $ClCd_2$ en el agua de bebida mas la administracion de apocinina via oral (50 mg/Kg) y el grupo Ctrl-Apo durante 8 semanas. Además también se incluyó el grupo CTRL al cual se le dió agua *ad libitum.*

A los animales del grupo Ctrl y grupos cadmio de los diferentes modelos experimentales se les determinó los siguientes parámetros: para el modelo agudo se determinó peso, glucosa y presión arterial antes y después de las 24 horas de la administración de cadmio o vehículo previo a su sacrificio. Para el modelo crónico 4 y 8 semanas se determinó también peso, glucosa y presión arterial antes y al final de la exposición de cadmio.

6.3 Medición de la presión arterial

La medición de la presión arterial se llevó acabo por medio de pletismógrafía, utilizando un medidor de presión (Panlab LE5007). Las mediciones se realizaron para todos los grupos experimentales. La medición fue realizada en el animal consciente, y previamente entrenado; se obtuvo el valor de presión arterial sistólica a partir del promedio de tres registros consecutivos.

6.4 Estudios de reactividad vascular

6.4.1 Aislamiento de la aorta obtención de anillos arteriales

Al final del seguimiento para cada grupo experimental los animales fueron anestesiados con Ketamina (60 mg/Kg) y xilaxina (7 mg/ kg). Una vez anestesiadas se realizó una taracomia anterior para realizar la extracción de la aorta torácica; se procedió a limpiar el tejido conectivo y se realizaron anillos de aorta de 2-3 mm de largo.

6.4.2 Medición de presión de perfusión a través de la arteria mesentérica

Para la obtención del tejido se realizó una incisión a nivel abdominal del animal para localizar la arteria mesentérica, posterior a esto se procedió a ligar la rama ileicolíca y cólica [McGregor, 1995]. Se realizó una incisión en la rama principal del lecho y con un punzo cat calibre 18 se canulo la arteria mesentérica. El lecho mesentérico aislado se colocó en una cámara de tejido aislado a 37 ^{o}C y se perfundió *in situ* con solución Krebs Henseleit a una velocidad de 2 ml/min a través de una bomba de perfusión (Masterflex Cole Parmer).

6.5 Protocolos experimentales

6.5.1 Registro de tensión isométrica

Los anillos arteriales se colocaron en las copas de Allhin, conteniendo solución de Krebs-Henseleit a 37^{o}C y burbujeada con una mezcla carbógena (95% O_2 y 5% CO_2). La composición de la solución fue la siguiente (mM/l): NaCl 118, KCl 4.75, $NaHCO_3$ 25, $MgSO_4$ 1.2, $CaCl_2$ 2.0, $KH2PO_4$ 1.2 y Glucosa 11. Se montaron los anillos de aorta entre dos alambres de acero inoxidable con forma de L, uno de los cuales se fijó a la copa y el

otro a un transductor isométrico. Los protocolos se realizaron en preparaciones provenientes de todos los grupos experimentales. La respuesta contráctil fue registrada mediante un convertidor analógico-digital (Powerlab) y se almacenó en una computadora empleando el software Lab chart 7.0. A los anillos se les aplicó una tensión basal de 2g. En estas condiciones, las preparaciones fueron estabilizadas durante un periodo de 30 min antes de iniciar cualquier protocolo experimental.

6.5.1.1 Curvas concentración respuesta a acetilcolina en aorta

Se realizaron curvas de concentración-respuesta acumulativa Acetilcolina (Ach) en todos los grupos experimentales. Los protocolos se realizaron de la siguiente manera: después del periodo de estabilización de los anillos arteriales en las copas de Allhin, las preparaciones fueron pre-contraídas colocándolas en una cámara a una concentración de fenilefrina de $1x10^{-6}$ M y cuando se alcanzó el estado estacionario se procedió a realizar las curvas concentración-respuestas acumulativas de ACh en un rango de concentraciones de $1x10^{-9}$ M hasta $3x10^{-5}$ M en presencia/ausencia de apocinina (300 µmol/L). Los protocolos se realizaron en preparaciones provenientes de todos los grupos experimentales.

6.5.1.2 Curvas concentración respuesta a agonistas contráctiles en aorta

Se realizaron curvas de concentración-respuesta acumulativa fenilefrina, 5-HT y U46619 en todos los grupos experimentales. Los protocolos se realizaron de la siguiente manera: después del periodo de estabilización de los anillos arteriales en las copas de Allhin, las preparaciones fueron contraídas colocando en la cámara una concentración de KCl de 80 mM hasta que la tensión desarrollada fuera la máxima y alcanzara un estado estable; después fueron lavadas con solución Krebs Henseleit y cuando alcanzaron su estabilidad se procedió a realizar las curvas concentración-respuestas a los agonistas contráctiles respectivos en un rango de concentraciones de $1x10^{-9}$ M hasta $3x10^{-5}$ M en presencia/ausencia de Apo (300 µmol/L). Estos protocolos fueron hechos en preparaciones con el endotelio intacto. Los protocolos se realizaron en preparaciones provenientes de todos los grupos experimentales.

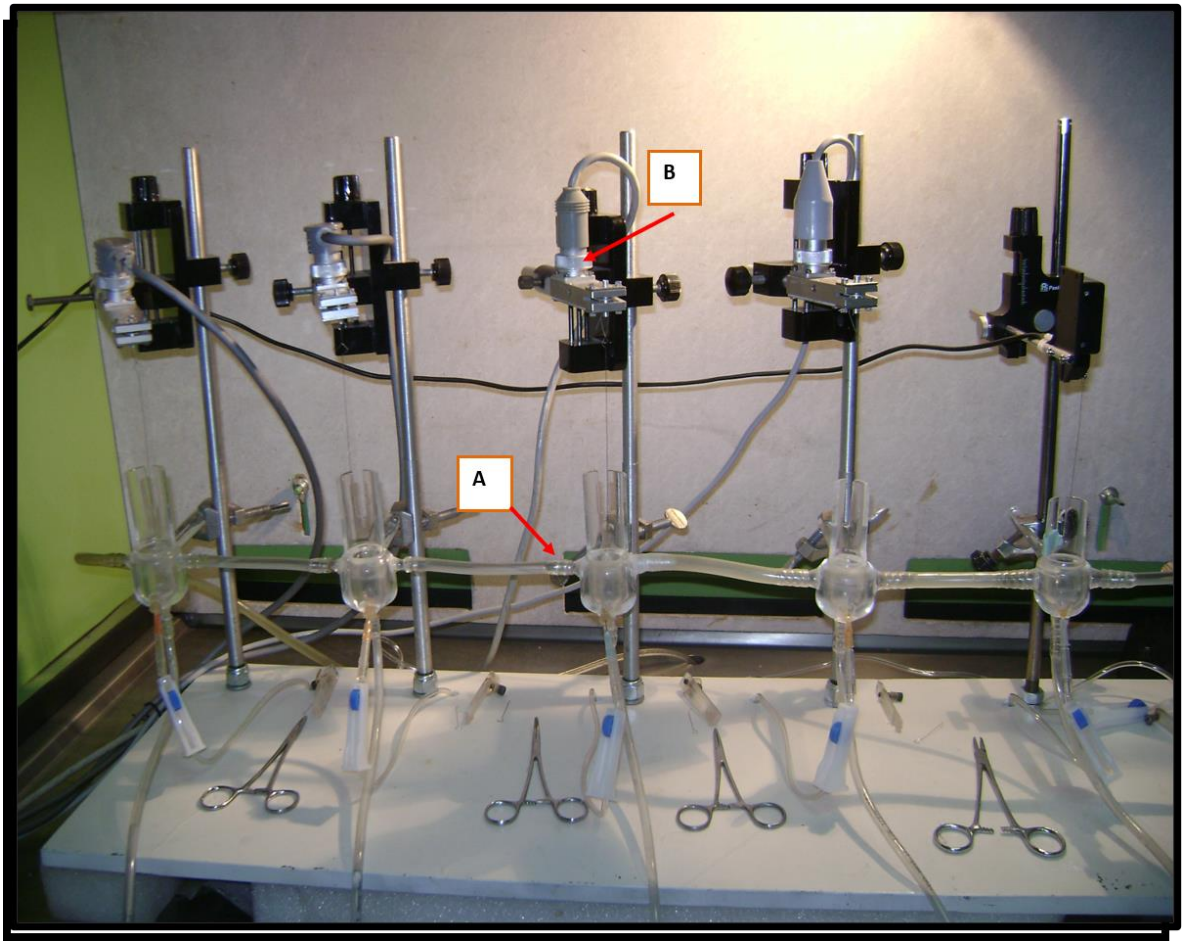


Figura 13. Sistema de registro para registro de contracción isométrica de aorta. Se muestra el sistema de registro de tensión isométrica. A) copas de Allhin. B) Transductor isométrico

6.5.2 Registro de presión de perfusión en arteria mesentérica

6.5.2.1 Curvas concentración respuesta a acetilcolina en arteria mesentérica

Los cambios en la resistencia vascular del lecho mesentérico fueron medidos como modificaciones en la presión de perfusión y se registraron mediante un transductor de presión (GOULD P23) acoplado a un amplificador DC T001. En todos los experimentos, la preparación se dejó equilibrar durante 30 minutos después de que fueron montadas las preparaciones. Los protocolos fueron realizados de la siguiente manera: después del periodo de estabilización del lecho mesentérico, las preparaciones fueron pre-contraídas con una concentración de concentración de fenilefrina de $1x10^{-6}$ M y cuando se alcanzó el estado estacionario se procedió a realizar las curvas concentración-respuestas acumulativas de ACh en un rango de concentraciones de $1x10^{-9}$ M hasta $3x10^{-5}$ M en presencia/ausencia

de Apo (300 µmol/L). Estos protocolos fueron hechos en preparaciones con el endotelio intacto. Los protocolos fueron realizados en preparaciones provenientes de todos los grupos experimentales.

6.5.2.1 Curvas concentración respuesta a agonistas contráctiles

Se realizaron curvas concentración-respuesta acumulativa fenilefrina y 5-HT en todos los grupos experimentales. Los protocolos se realizaron de la siguiente manera: después del periodo de estabilización de los lechos mesentéricos, las preparaciones fueron contraídas colocando en la cámara de tejido aislado una concentración de KCl de 80 mM hasta que la tensión desarrollada fuera la máxima y alcanzara un estado estable; después fueron lavadas con solución Krebs Henseleit y cuando alcanzaron su estabilidad se procedió a realizar las curvas concentración-respuestas a los agonistas contráctiles respectivos en un rango de concentraciones de $1x10^{-9}$ M hasta $3x10^{-5}$ M en presencia/ausencia de Apo (300 µmol/L). Estos protocolos fueron hechos en preparaciones con el endotelio intacto.

6.7 Parámetros bioquímicos

6.7.1 Determinación de marcadores de lipoperoxidación

6.7.1.1 Ensayos de MDA y 4-HDA

El MDA y 4-HDA se midieron en aorta y lecho mesentérico, los ensayos fueron realizados por el método de Esterbauer (1991). El principio del método fue la medición espectrofotométrica del color producido durante la reacción del 1-metil 2 fenilindol con MDA. Se determinó proteína totales del homogenizado de cada muestra de tejido por el método de Lowry. El día de estudio, las muestras de aorta y lecho mesentérico se homogenizaron (1/10, p/v) fue agregado un tampón de 0.05 M de fosfato de potasio, pH 7,8. El homogeneizado se centrifugó a 10000 g durante 15 min a 4ºC. Se utilizó sobrenadante para la determinación de concentración de MDA, se midieron las absorbancias a 586 nm. La cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico se determinó comparando la absorción con la curva estándar de los equivalentes de MDA generados por la hidrólisis catalizada por ácido 1,1,3,3 tetrametoxipropano.

6.7.2 Actividad enzimática

6.7.2.1 Ensayos de actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de la enzima fue medida a través del método de Paglia y Valentine (1967). El buffer de trabajo consistió en un regulador de fosfato de potasio de 50 mi pH 7, 1 mil de EDTA, 1 mi NaN_3 (para inhibir la catalasa), 0.2 mi de NADPH, 1 unidad de glutatión reductasa y 1 mM de GSH. Estos reactivos fueron combinados al inicio de cada día. La fracción del halogenado (0.1 mL) fue agregada a 0.8 ml de regulador de trabajo y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, antes del inicio de la reacción por adiciona de 0.1 mL de la solución de peróxido de hidrogeno (0.25 mM). La muestra se disolvieron en 2 mL de regulador de fosfato de potasio (pH 7) 0.1 mol/L. La mezcla fue homogenizada y centrifugada a 13,000 g durante 15 minutos a 4 C. El sobrenadante obtenido se utilizaron para determinar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa a través de espectrofotometría a una absorbancia a 340 nm [Gonzales J, 1997].

6.7.2.2 Ensayos de actividad enzimática de la glutatión reductasa (GR)

Se preparó la muestra a 4 volúmenes (p/v) de regulador de fosfato KH_2PO_4 (139 mM) a un pH 7.4. Posterior a esto se colocó el homogenizado en tubos eppendorf y se centrifugo a 12 000 rpm a 4 C durante 15 min. El sobrenadante obtenidos fue utilizado para determinar la actividad de la enzima glutatión reductasa (Andersen y col., 1997).

La actividad fue determinada por la oxidación de la NAD(P)H a $NADP^+$ durante la reducción del glutatión oxidado (GSSG) [Valentine, 1997]. El reactivo principal fue preparado por la combinación de 18 mL de buffer de KH_2PO_4 (139 mmol/L de EDTA; pH 7.4) y 2 mL de NADPH (2.5 mmol/mL). La muestra (20 µL de 1:20 de buffer de KH_2PO_4), 220 µL de reactivo principal que contenia 5 µL de FAD (315 µmol/L) y 10 µL de buffer de KH_2PO_4 fueron colocados en una celda. Se leyó a una absorbancia de 340 nm a los 200 s (Paso A). Posterior a esto fue agregado 30 µL de GSSG (22 mmol/L) y se leyó de nuevo la absorbancia a los 175 s (Paso B). El volumen final de la reacción fue de 315 µL. La diferencia de absorbancias por minuto entre el paso A y B fue usado para calcular la actividad enzimática, usando la absortividad de la NADPH a 6.22×10^3 $Lmol^{-1}$ m^{-1}.

6.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± el error estándar de la media para un determinado número de anillos arteriales y lechos mesentéricos (n) de distintos animales. Las curvas concentración-respuesta para acetilcolina y para los agonistas contráctiles se ajustaron mediante el programa de análisis de datos Origin 8.5 con la siguiente ecuación logística.

$$E = \frac{E_{max}}{1+10^{-k*([fármaco] - pD2)}}$$

Dónde:

E es el efecto del fármaco.

Emax es el efecto máximo (un índice de la eficacia relativa del agente vasoactivo), que se expresa como porcentaje de la respuesta contráctil inicial.

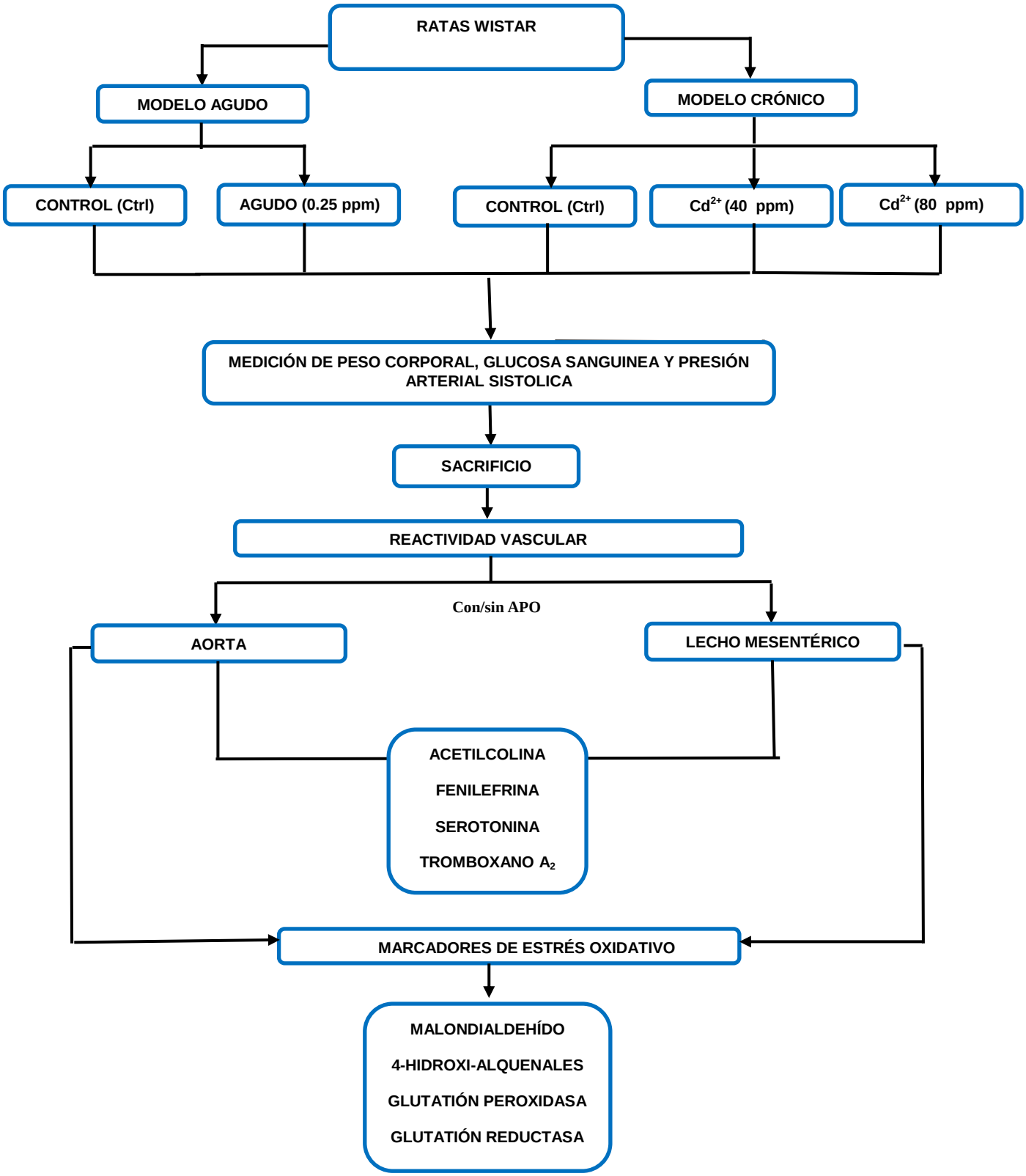
k es un factor que representa la pendiente de la curva.

pD2 es la concentración de fármaco necesaria para obtener un 50 % del Emax. Expresado como logaritmo negativo de dicha concentración (índice de la potencia del agente vasoactivo).

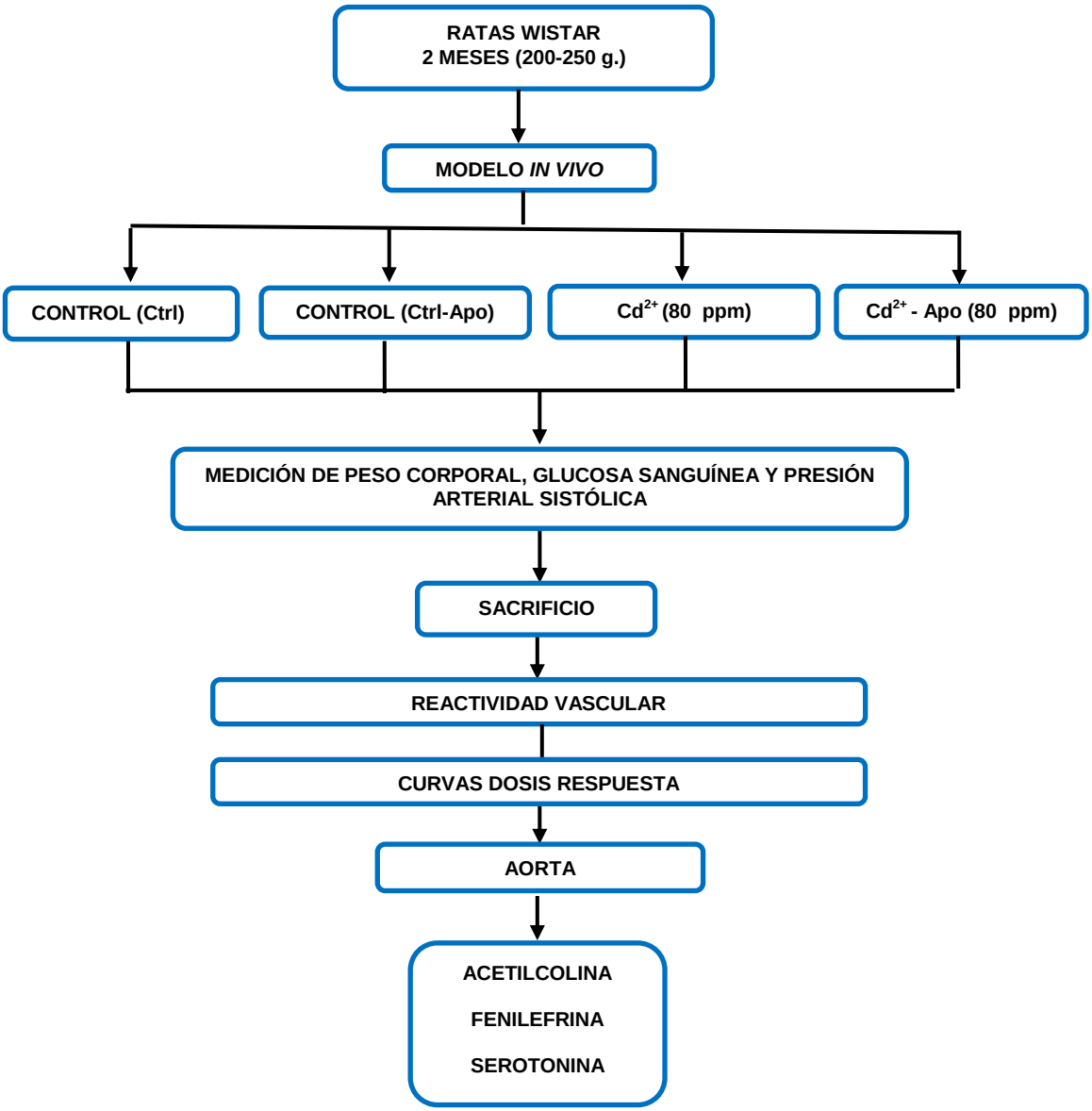
Estos parámetros fueron calculados a partir del ajuste de las curvas concentración-respuesta para cada experimento. Para el tratamiento estadístico se utilizaron el programa informático Origin 8.5.

Los resultados experimentales y controles se contrastarán con una prueba de t de Student para datos no apareados. Se considerarán estadísticamente significativas aquellas diferencias en las que $P \leq 0.05$.

6.8 Diagrama de trabajo



6.9 Diagrama de trabajo (modelo *in vivo*)



VII. RESULTADOS

7.1 Resultados obtenidos con el modelo de intoxicación aguda de cadmio

7.1.1 Características generales del modelo de administración aguda a cadmio

En el grupo de administración de Cd^{2+} (0.25 ppm) no se observaron cambios significativos en los parámetros de peso corporal, glucosa sanguínea y presión arterial sistémica con respecto al grupo Ctrl **(Tabla 3).**

	Peso (g.)	Glucosa sanguínea (mg/dL)	Presión arterial sistólica (mmHg)
Cd^{2+} (0.25 ppm)	225.4 ± 2.6	96.5 ± 1	101.5 ± 1.6
Ctrl	228.7 ± 0.3	97.6 ± 0.7	102.9 ± 1.8

Tabla 3. Efecto de la administración aguda de Cd^{2+} (0.25 ppm) sobre los valores de peso corporal, glucosa sanguínea y presión arterial sistólica**.** Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.1.2. Efecto de la ACh sobre el efecto relájante del NO en aorta de ratas con exposición aguda a cadmio

En esta serie experimental, se observó que la ACh induce una respuesta vasorelajante dependiente de la concentración en el rango de $1x10^{-9}$- $3x10^{-5}$ M empleada en los anillos arteriales. El análisis de las curvas concentración respuesta indico que la administración aguda de cadmio no modifica la respuesta vasodilatadora mediada por NO e inducida por ACh. El Emax del grupo Ctrl fue de 0.80 ± 0.03 mientras que en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 0.82 ± 0.01 **(Figura 14A).** No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 obtenidos en los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 6.7 ± 0.09 y para el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 7.1 ± 0.1 **(Figura 14B).**

7.1.3 Efecto de la fenilefrina en aorta de ratas con exposición aguda a cadmio

En esta serie experimental, se observó que la fenilefrina induce una respuesta contráctil dependiente de la concentración en el rango de $1x10^{-9}$- $3x10^{-5}$ M. El análisis de las curvas concentración respuesta indicó que el cadmio no modifica el Emax de la respuesta contráctil a fenilefrina con respecto al grupo Ctrl **(Figura 15A).** El Emax del grupo Ctrl fue de 1.07 ± 0.02, mientras que en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 97 ± 0.03. No se observaron cambios significativos entre los valores de Emax y pD2 de los grupos

estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 6.4 ± 0.09, mientras que para el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 6.5 ± 0.06 **(Figura 15B).**

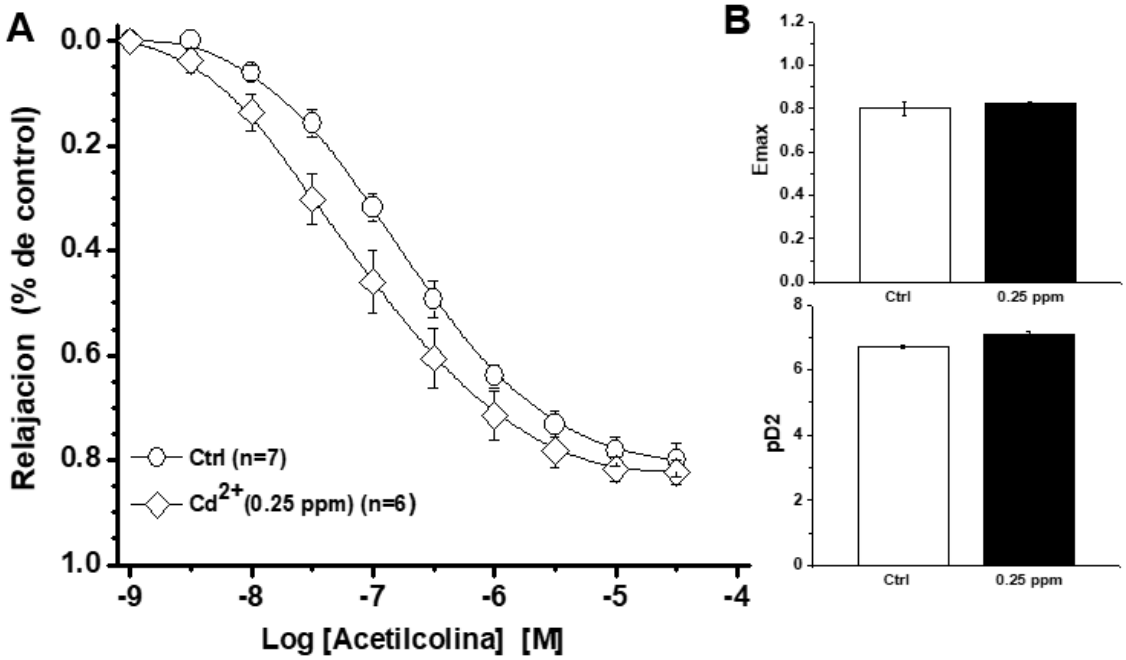


Figura 14. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en anillos de aorta. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de ACh; no se observa cambio en la respuesta vasodilatadora a ACh en el grupo tratado con cadmio con respecto al grupo de Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para el grupo tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.1.4 Efecto de la 5-HT en aorta de ratas con exposición aguda a cadmio

En esta serie experimental, se observó que la 5-HT induce una respuesta contráctil dependiente de la concentración en el rango de $1x10^{-9}$- $3x10^{-5}$ M. El análisis de las curvas concentración respuesta indicó que el cadmio no induce un incremento en el Emax de la respuesta contráctil a 5-HT en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) **(Figura 16A).** El Emax del grupo Ctrl fue de 1.1 ± 0.03, mientras que en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 98 ± 0.04. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD_2 de los grupos estudiados. La pD_2 para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 0.08, mientras que para el grupo Cd^{2+} (0.25ppm) fue de 5.5 ± 0.1 **(Figura 16B).**

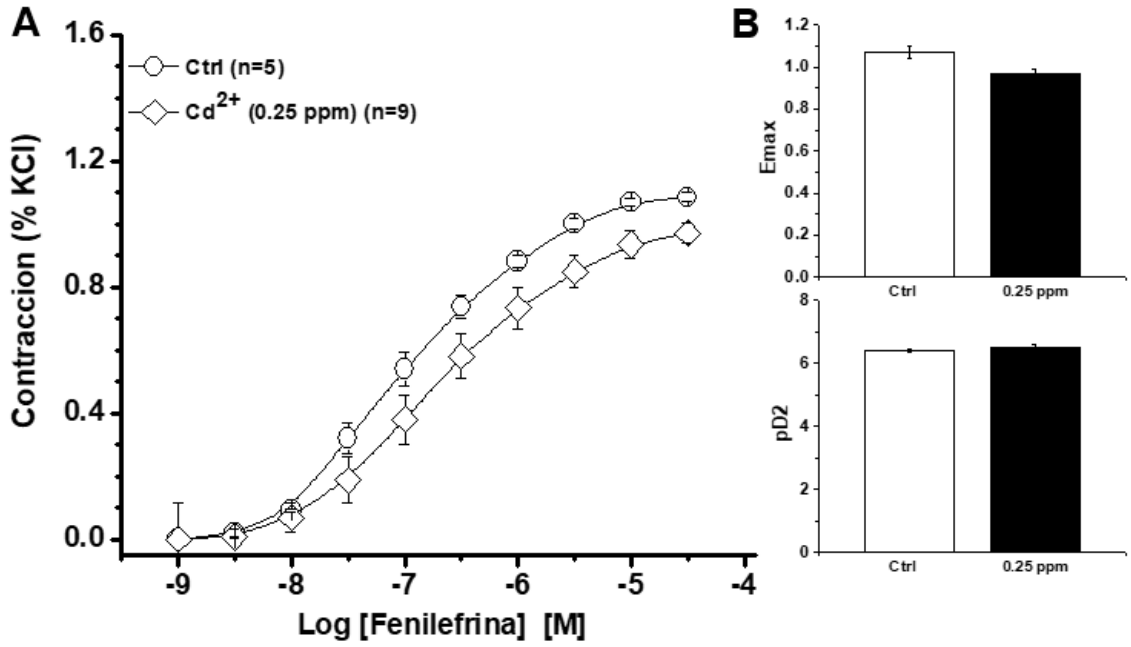


Figura 15. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en anillos de aorta. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de fenilefrina; no se observa cambio en la respuesta contráctil a fenilefrina en el grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para el grupo tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

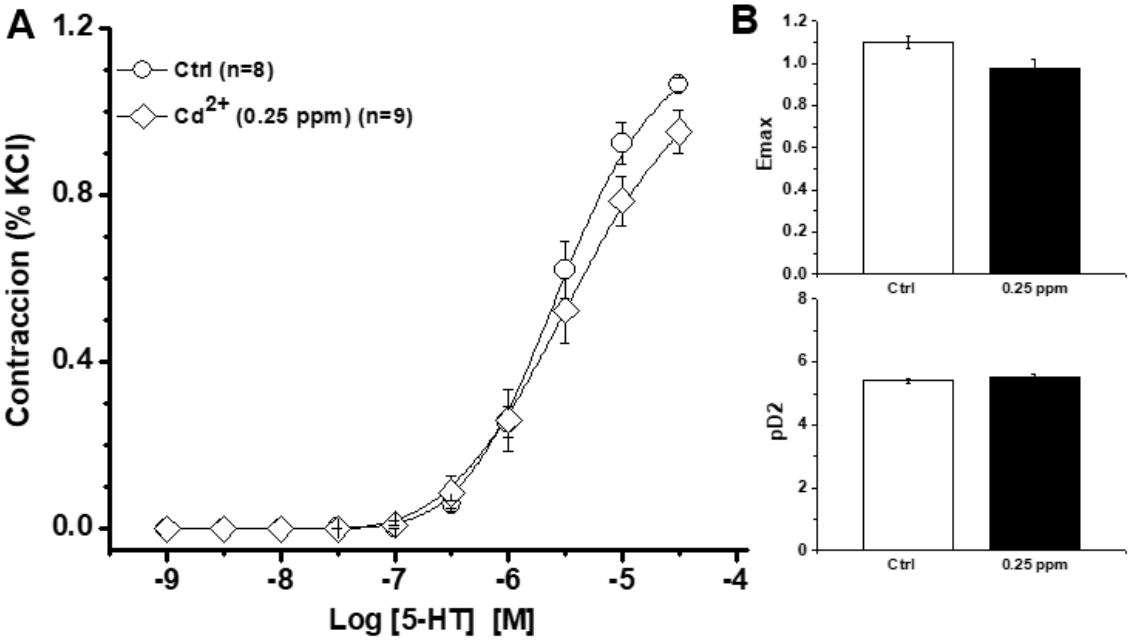


Figura 16. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a 5-HTen anillo de aorta. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de 5-HT; no se observa cambio en la respuesta contráctil a 5-HT en el grupo tratado con cadmio con respecto a los del grupo de Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para el grupo tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.1.5 Efecto de la ACh en lecho mesentérico de ratas con exposición aguda a cadmio

En esta serie experimental, se observó que la ACh induce una respuesta vasorelajante dependiente de la concentración en el rango de $1x10^{-9}$- $3x10^{-5}$. El análisis de las curvas concentración respuesta indicó que la administración aguda de Cd^{2+} no modifica la respuesta vasodilatadora mediada por NO e inducida por ACh. El Emax del grupo Ctrl fue de 0.80 ± 0.01, mientras que en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 74 ±0.03 **(Figura 17A).** No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 obtenidos en los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 6.5 ± 0.1, para el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 6.7 ± 0.07 **(Figura 17B).**

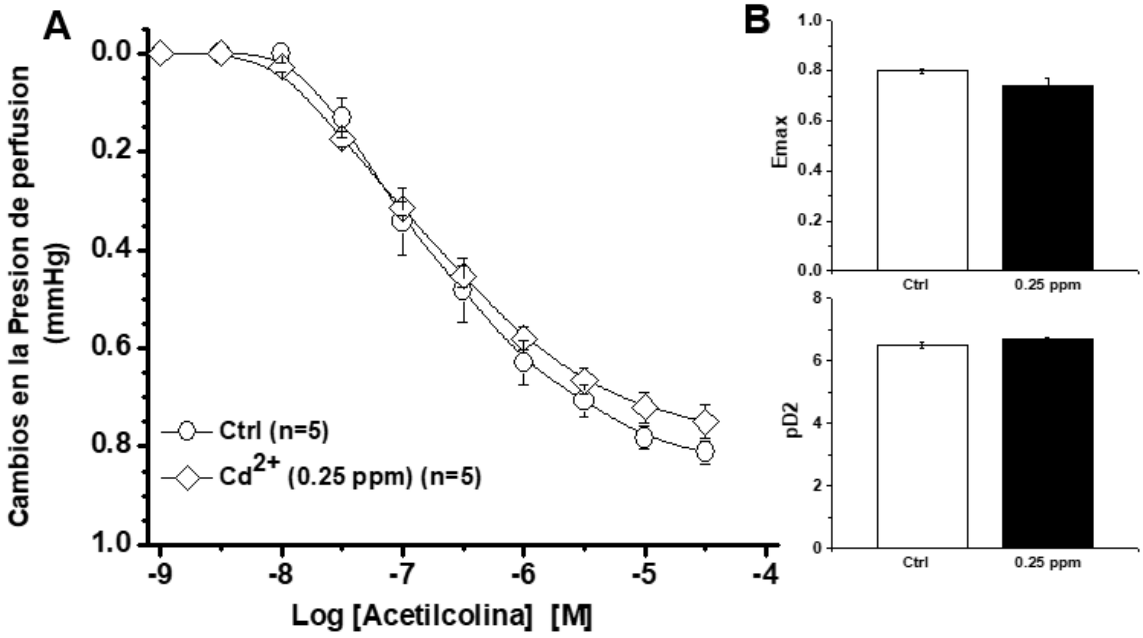


Figura 17. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en lecho mesentérico. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de ACh; no se observa cambio en la respuesta vasodilatadora a ACh en el grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para el grupo tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.1.6 Efecto de la fenilefrina en lecho mesentérico de ratas con exposición aguda a cadmio

El análisis de las curvas concentración respuesta indicó que el Cd^{2+} no induce un incremento en el Emax de la respuesta contráctil a fenilefrina en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) **(Figura 18A).** El Emax del grupo Ctrl fue de 62 ± 2.6 mientras que en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 68 ± 2.7. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 de los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 0.1, mientras que para el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 5.6 ± 0.1 **(Figura 18B).**

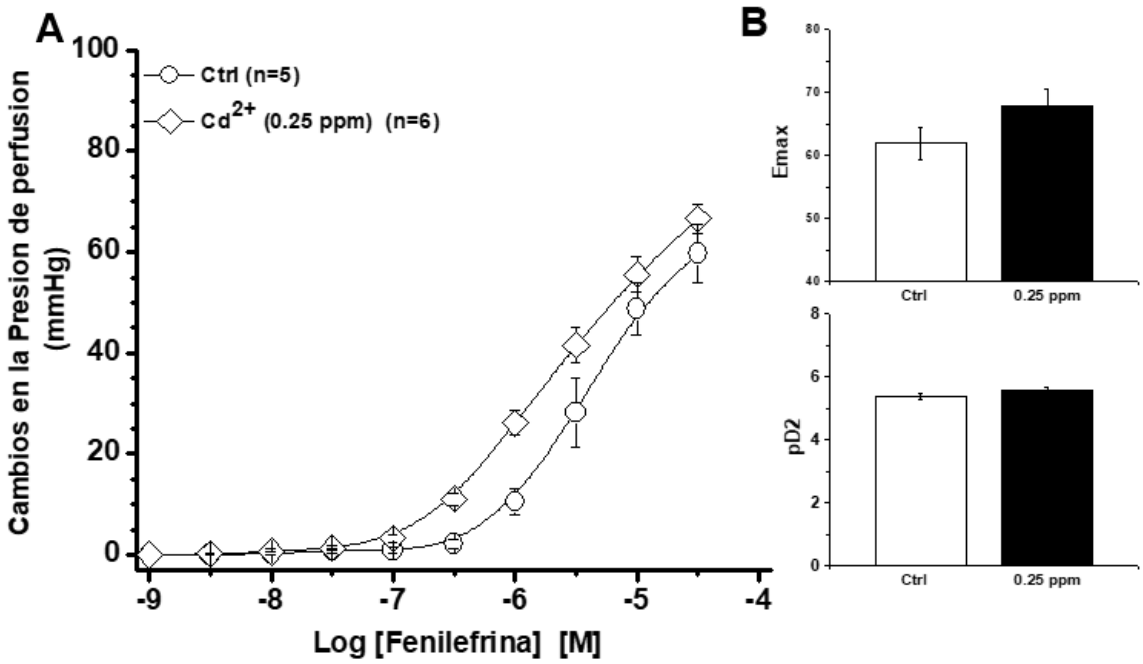


Figura 18. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en lecho mesentérico. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de fenilefrina; no se observa cambio en la respuesta contráctil a fenilefrina en el grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para el grupo tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.1.7 Efecto de la 5-HT en lecho mesentérico de ratas con exposición aguda a cadmio

El análisis de las curvas concentración respuesta indicó que el Cd^{2+} no induce un incremento en el Emax de la respuesta contráctil a 5-HT en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) **(Figura 19A).** El Emax del grupo Ctrl fue de 70.3 ± 2.8, mientras que en el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 68.9 ± 2.4. No se observaron cambios significativos entre los valores de

la pD2 de los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 0.08, mientras que para el grupo Cd^{2+} (0.25 ppm) fue de 5.5 ± 0.1 **(Figura 19B).**

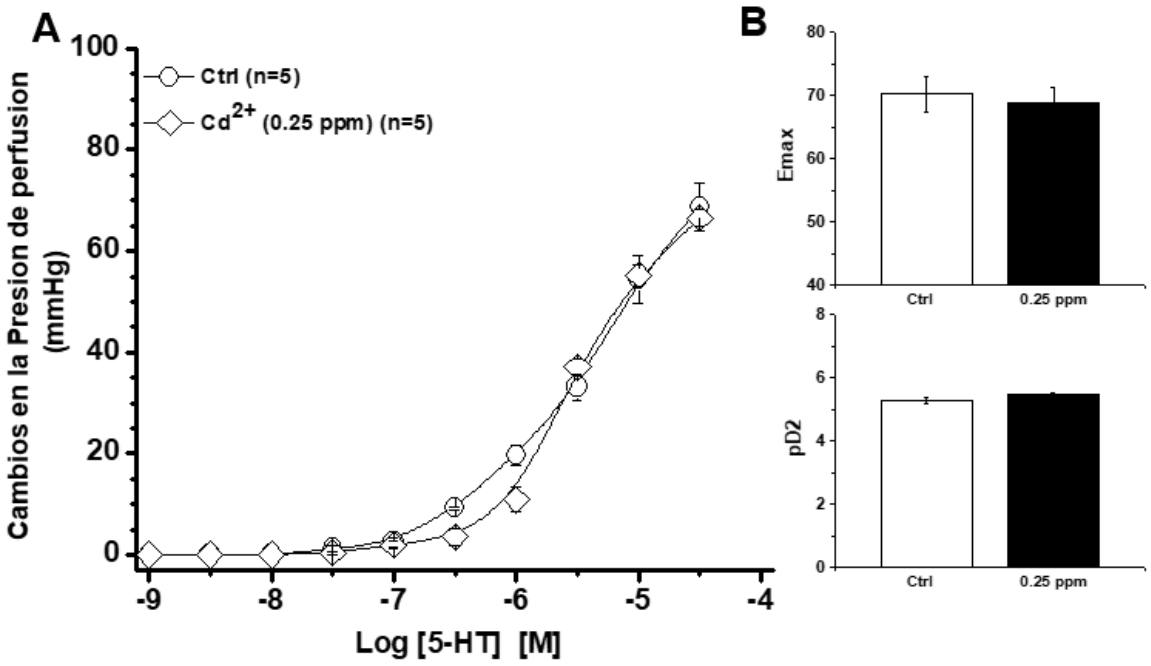


Figura 19. Efecto de la exposición aguda de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a 5-HT en lecho mesentérico. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de 5-HT; no se observa cambio en la respuesta contráctil a 5-HT en el grupo tratado con Cd^{2+} con respecto a los del grupo de Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para el grupo tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.2 Resultados obtenidos con el modelo de intoxicación crónica de cadmio

7.2.1 Características generales del modelo de administración crónica a cadmio

Al término de las 8 semanas de la fase experimental se encontró una disminución significativa en el peso corporal, para el grupo de Cd^{2+} (40 ppm) y Cd^{2+} (80 ppm) con respecto al grupo Ctrl respectivamente**.** Además se encontró un incremento significativo en los valores de glucosa sanguínea ($p<0.05$) para ambos grupos tratados con cadmio con respecto al grupo Ctrl **(Tabla 4)**.

	Peso (g.)		Glucosa sanguínea (mg/dL)	
Semana	**0**	**8**	**0**	**8**
Ctrl	235.3 ± 3.7	419.5 ± 3.1	95.7 ± 1.2	98.5 ± 0.9
Cd^{2+}(40 ppm)	222.6 ± 2.6	380.9 ± 5.8*****	96.1 ± 1.06	110 ± 1.09*****
Cd^{2+}(80 ppm)	227.3 ± 4.8	379.3 ± 9.6*	97.8 ± 0.8	115.5 ± 0.8*

Tabla 4. Efecto de la administración crónica de cadmio de Cd^{2+} (40 y 80 ppm) sobre los valores de peso corporal y glucosa sanguínea. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una P≤ 0.05 vs Ctrl.

El análisis de los valores de presión arterial indicó que el cadmio genera un incremento de la presión arterial sistólica para el grupo de Cd^{2+} (40 y 80 ppm) con respecto al grupo Ctrl. Se observó que los grupos tratados con cadmio presentaron un incremento en la presión arterial a partir de la 2ª Semana, observado que el efecto es dosis y tiempo dependiente **(Figura 20)**.

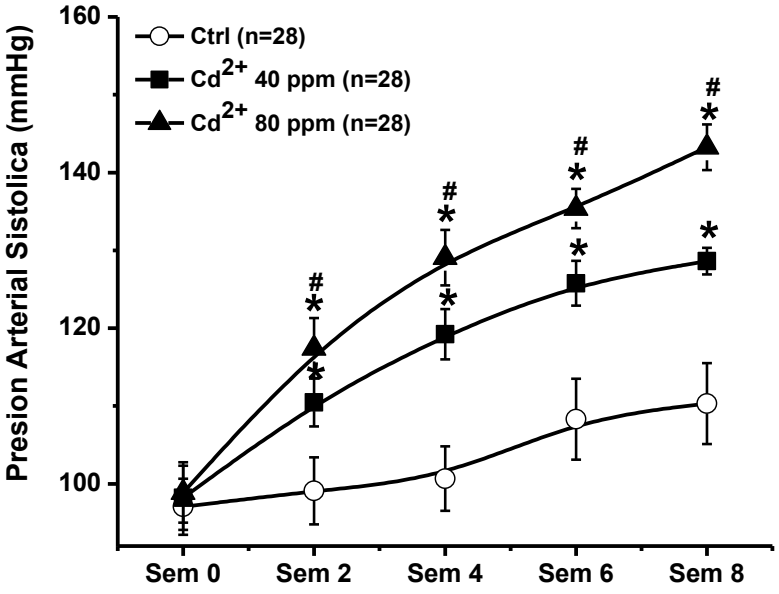


Figura 20. Efecto de la administración crónica de cadmio de Cd^{2+} (40 y 80 ppm) sobre los valores de presión arterial sistólica. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una P≤ 0.05 vs Ctrl; ($^{\#}$) P≤ 0.05 vs Cd^{2+} (40 ppm).

7.2.2 Evaluación de la respuesta relajante en aorta durante la hipertensión arterial generada por cadmio a una exposición crónica de 8 semanas

El análisis de las curvas concentración respuesta mostró una disminución en el efecto relajante mediado por NO e inducido por ACh en los grupos con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl, indicador de la posible presencia de disfunción endotelial. El Emax del efecto relajante de ACh para el grupo Ctrl fue de 0.80 ± 0.03, para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 0.51 ± 0.02 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.48 ± 0.05 (**Figura 21A).** No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 obtenidos en los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 6.7 ±0.09, para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 6.6 ± 0.01 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 6.5 ± 0.13 (**Figura 21B)**.

En las curvas dosis respuesta a ACh en presencia de Apo para los grupos tratados con cadmio se observó la abolición del efecto relajante inducido por ACh con respecto al grupo Ctrl. El Emax de la respuesta relajante de ACh para el grupo Ctrl fue de 0.80 ± 0.03, el grupo Ctrl/Apo 0.77 ± 0.03 mientras que en los grupos Cd^{2+} (40 y 80 ppm) en presencia de Apo, el Emax de la respuesta relajante de Ach fue de 0.71 ± 0.05 y 71 ± 0.02 respectivamente (**Figura 22A y 23A)**. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 obtenidos en los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 6.7 ± 0.09, el grupo Ctrl/Apo fue de 6.8 ± 0.18; para el grupo Cd^{2+}/Apo (40 ppm) fue de 6.6 ±0.1 y para el grupo Cd^{2+}/Apo (80 ppm) fue de 6.7 ± 0.13 **(Figura 22B y 23B)**.

7.2.3 Efecto de la fenilefrina en aorta de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas

En esta serie experimental, se observó que la fenilefrina induce una respuesta contráctil dependiente de la concentración en el rango de $1x10^{-9}$- $3x10^{-5}$ M. El análisis de las curvas concentración dosis respuesta indicó que el Cd^{2+} no induce un incremento en el Emax de la respuesta contráctil a fenilefrina en el grupo Cd^{2+} (40 ppm), pero si en el grupo Cd^{2+} (80 ppm) con respecto al grupo Ctrl; **(Figura 24A).** El Emax del grupo Ctrl fue de 1.08 ± 0.01, mientras que en el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 1.03 ± 0.04 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm)

fue de 1.26 ± 0.02. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 obtenidos en los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 7.0 ± 0.07, mientras que para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 6.9 ± 0.07 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 7.1 ± 0.05 (**Figura 24B).**

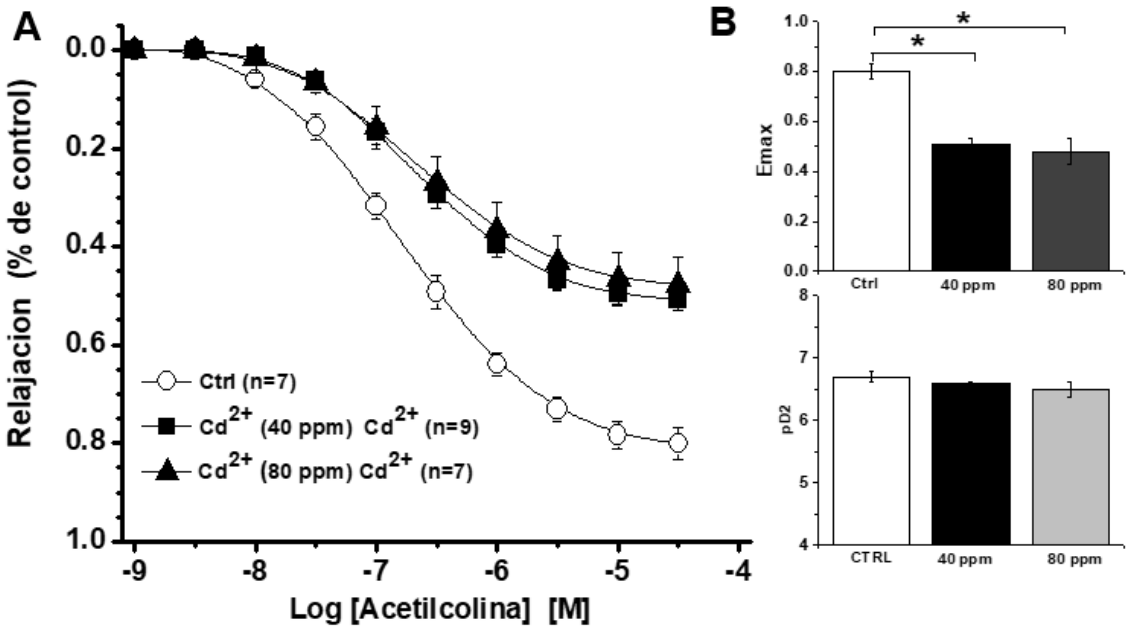


Figura 21. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en anillos de aorta. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de ACh; se observa una disminución de la respuesta vasodilatadora en los grupos tratados con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

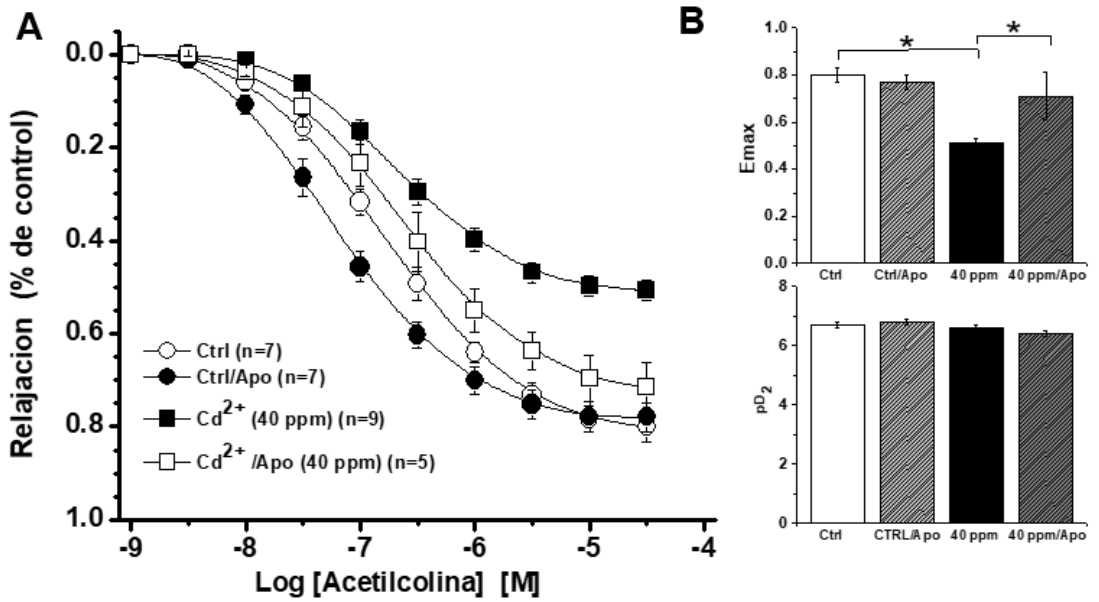


Figura 22. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la disfunción endotelial inducida por cadmio en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas de ACh; se observa que la Apo revierte la disfunción endotelial en los grupo tratado con Cd^{2+}. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

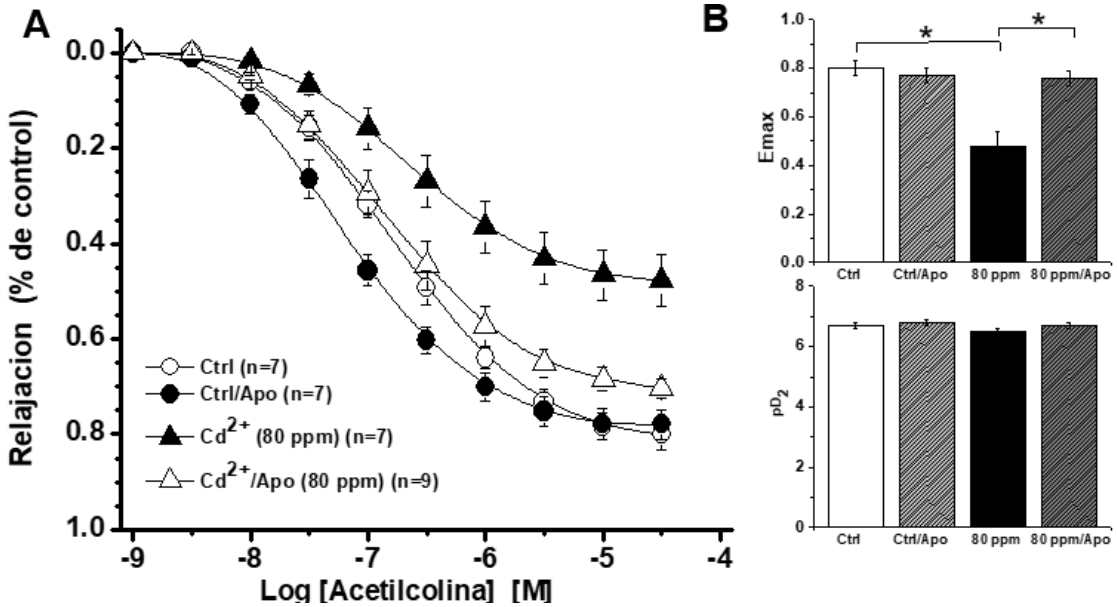


Figura 23. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la disfunción endotelial inducida por cadmio en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas de ACh; se observa que la Apo revierte la disfunción endotelial en los grupo tratado con Cd^{2+}. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

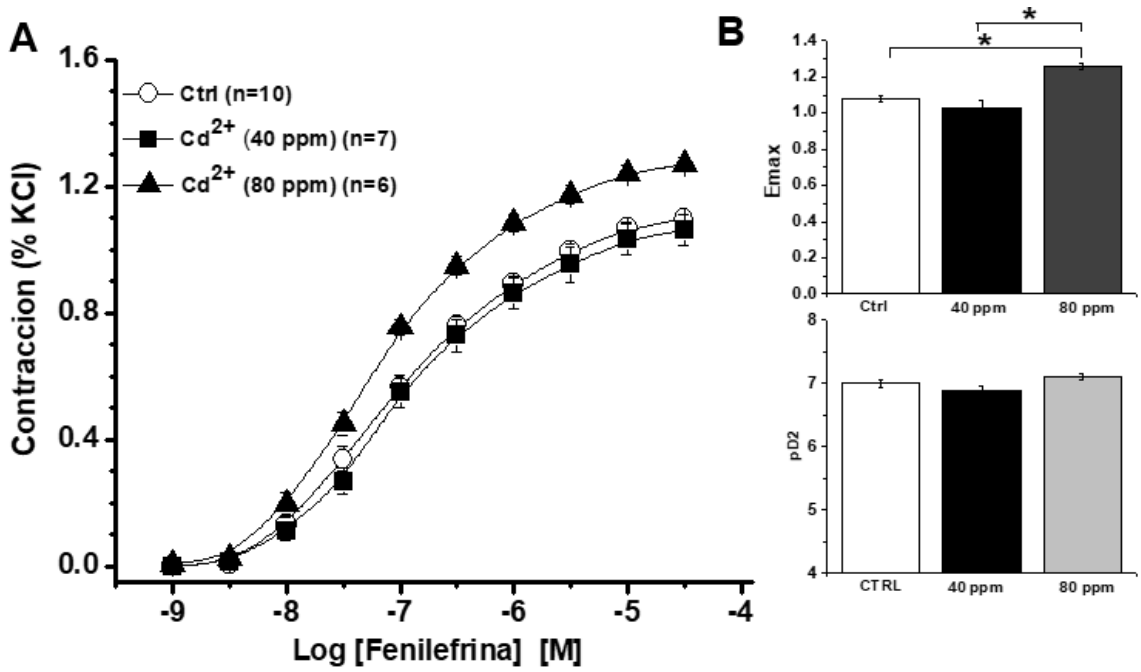


Figura 24. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a fenilefrina; se observa la respuesta contráctil desarrollada por fenilefrina en los grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

La respuesta contráctil de fenilefrina fue analizada en presencia de Apo; no se observaron cambios en el Emax de la respuesta contráctil para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) pero si una disminución en el Emax de la respuesta contráctil para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) **(Figura 25A y 26A).** El Emax para el grupo Ctrl fue de 1.08 ± 0.01, el grupo Ctrl/Apo 110 ± 0.01, mientras que las preparaciones del grupo Cd^{2+} (40 y 80 ppm) fue de 1.0 ± 0.04 y 1.11 ± 0.01 en presencia de Apo. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD_2 de los grupos estudiados. La pD_2 para el grupo Ctrl fue de 7.0 ± 0.07; el grupo Ctrl/Apo 7.2 ± 0.03, mientras que para el grupo Cd^{2+} /Apo (40 y 80 ppm) fue de 6.9 ± 0.07 y 6.9 ± 0.06 **(Figura 25B y 26B).**

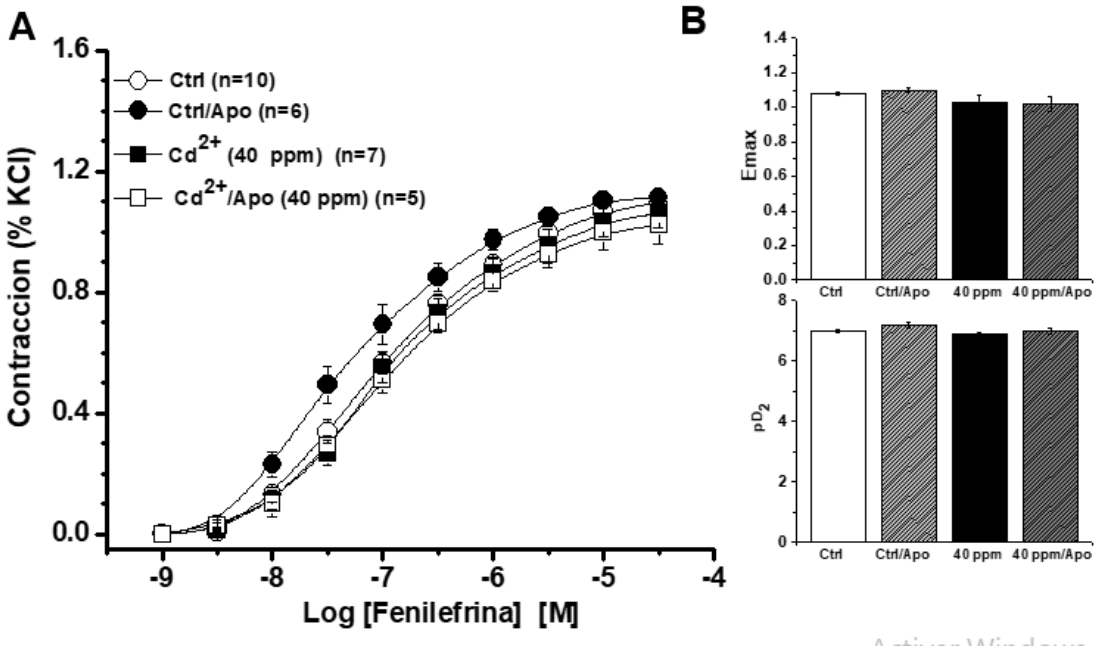


Figura 25. Participación de la NAD(P)H oxidasa sobre la respuesta contráctil a fenilefrina durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas de fenilefrina; no se observa que la Apo modifique la respuesta contráctil en los grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

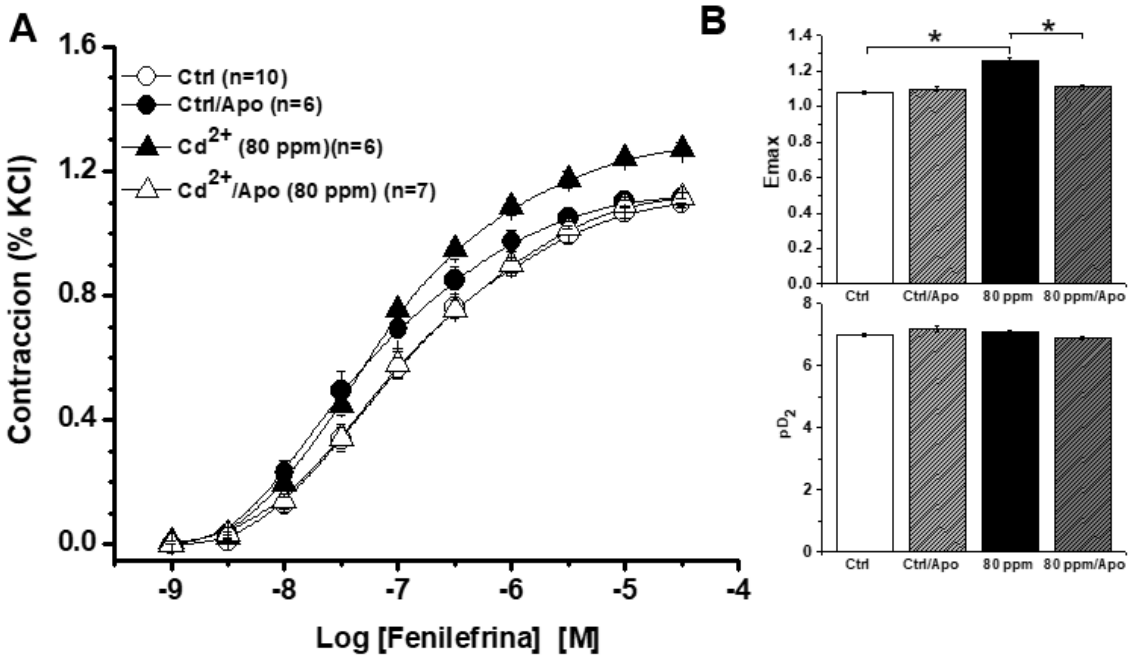


Figura 26. Participación de la NAD(P)H oxidasa sobre la respuesta contráctil a fenilefrina durante **la HAS generada por cadmio en anillos de aorta.** En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas de fenilefrina; se observa que la Apo disminuye la respuesta contráctil en los grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.2.4 Efecto de la 5-HT en aorta de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas

En esta serie experimental, se observó que la 5-HT induce una respuesta contráctil dependiente de la concentración en el rango de $1x10^{-9}$- $3x10^{-5}$ M. El análisis de las curvas concentración dosis respuesta indicó que el Cd^{2+} induce un incremento del Emax de la respuesta contráctil a 5-HT en el grupo Cd^{2+} (40 y 80 ppm) con respecto al grupo Ctrl **(Figura 27A).** El Emax del grupo Ctrl fue de 1.12 ± 0.04, mientras que para las preparaciones en el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 1.44 ± 0.03 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 154 ± 0.01. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 de los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 0.03, mientras que para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 5.6 ± 0.05 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 5.7 ± 0.1 **(Figura 27B).**

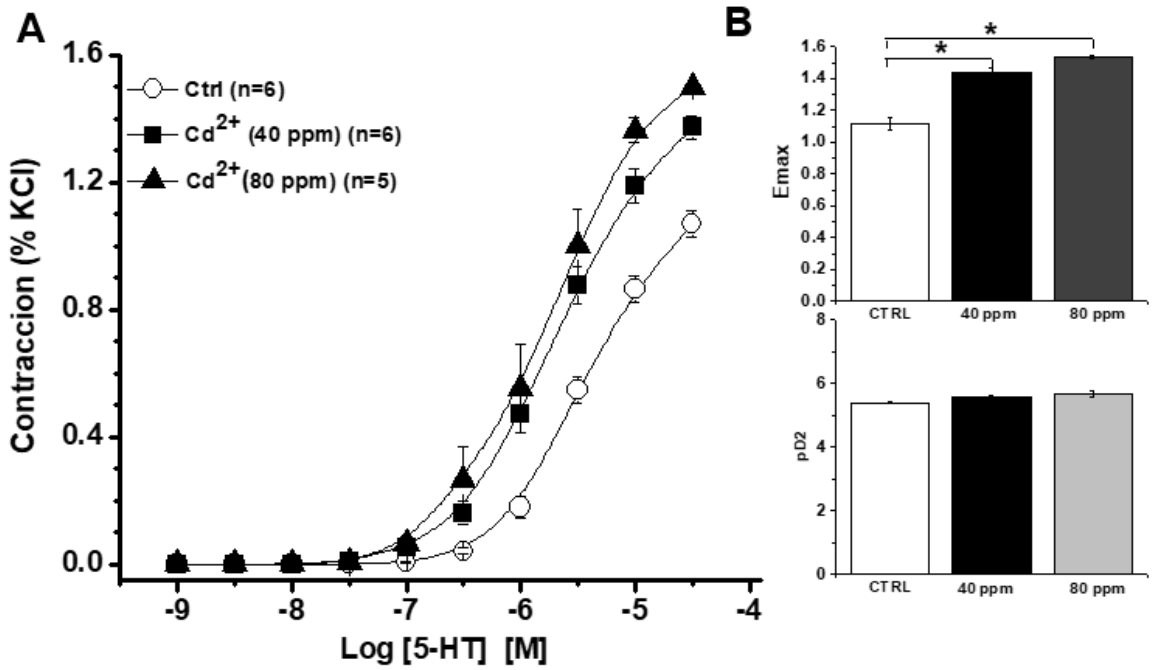


Figura 27. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a 5-HT en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a 5-HT; se observa un incremento de la respuesta contráctil en los grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

El incremento de la respuesta contráctil a 5-HT fue analizada en presencia de Apo; se observó una disminución significativa en el Emax de la respuesta contráctil en ambos grupos de Cd^{2+} **(Figura 28A y 29A).** El Emax para el grupo Ctrl fue de 112 ± 0.04, el grupo Ctrl/Apo 1.05 ± 0.05 y en preparaciones del grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 112 ± 0.04 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 1.09 ± 0.05 en presencia de Apo. No se obtuvieron cambios significativos en los valores de pD2 entre los grupos estudiados. El valor obtenido para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 0.03; el grupo Ctrl/Apo 5.4 ± 0.08 para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 5.5 ± 0.10 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 5.7 ± 0.01 **(Figura 28B y 29B)**

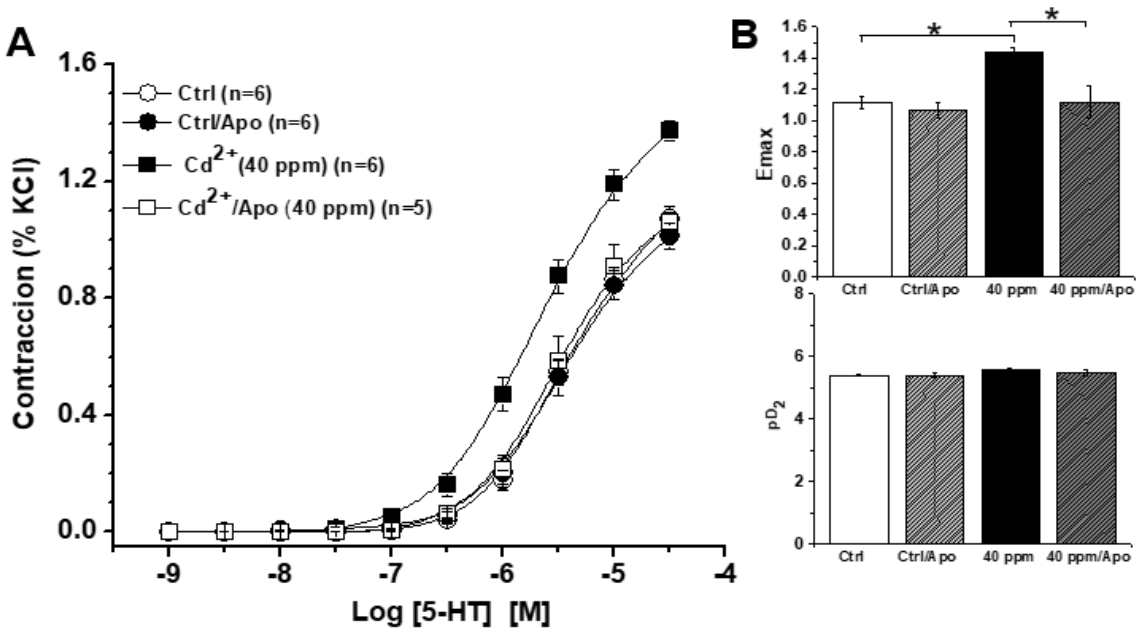


Figura 28. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a 5-HT durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a 5-HT; se observa que la Apo disminuye la respuesta contráctil en los grupos tratados con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

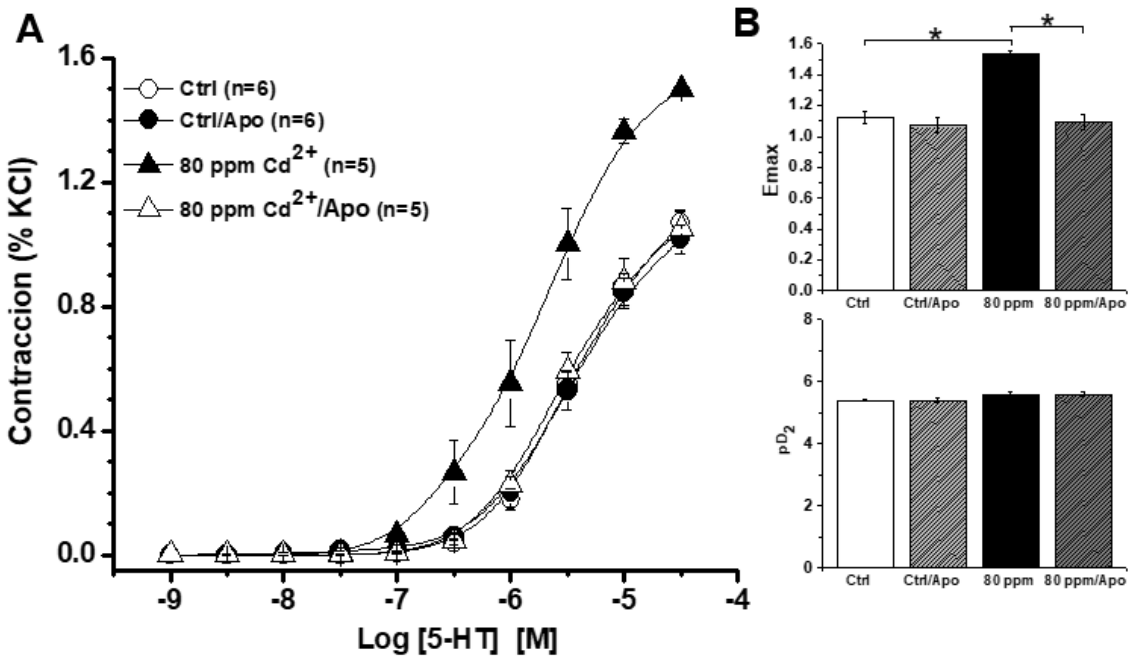


Figura 29. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a 5-HT durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a 5-HT; se observa que la Apo disminuye la respuesta contráctil en los grupos tratados con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.2.5 Efecto del U46619 en aorta de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas

En esta serie experimental, se observó que el U46619 induce una respuesta contráctil dependiente de la concentración en el rango de $1x10^{-9}$- $3x10^{-5}$ M. El análisis de las curvas concentración dosis respuestas indicó que el Cd^{2+} induce un incremento del Emax de la respuesta contráctil a U46619 en el grupo Cd^{2+} (40 y 80 ppm) con respecto al grupo Ctrl **(Figura 30A y 30B).** El Emax del grupo Ctrl fue de 1.02 ± 0.02, mientras que en el grupo de Cd^{2+} (40 ppm) fue de 145 ± 0.04 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 160 ± 0.05. Se observaron cambios significativos entre los valores de pD2 entre el grupo Cd^{2+} (40 ppm) vs Cd^{2+} (80 ppm). La pD2 para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 0.13, mientras que para el grupo de Cd^{2+} (40 ppm) fue 5.6 ± 0.18 y el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 6.3 ± 0.2 **(Figura 30A y 30B).**

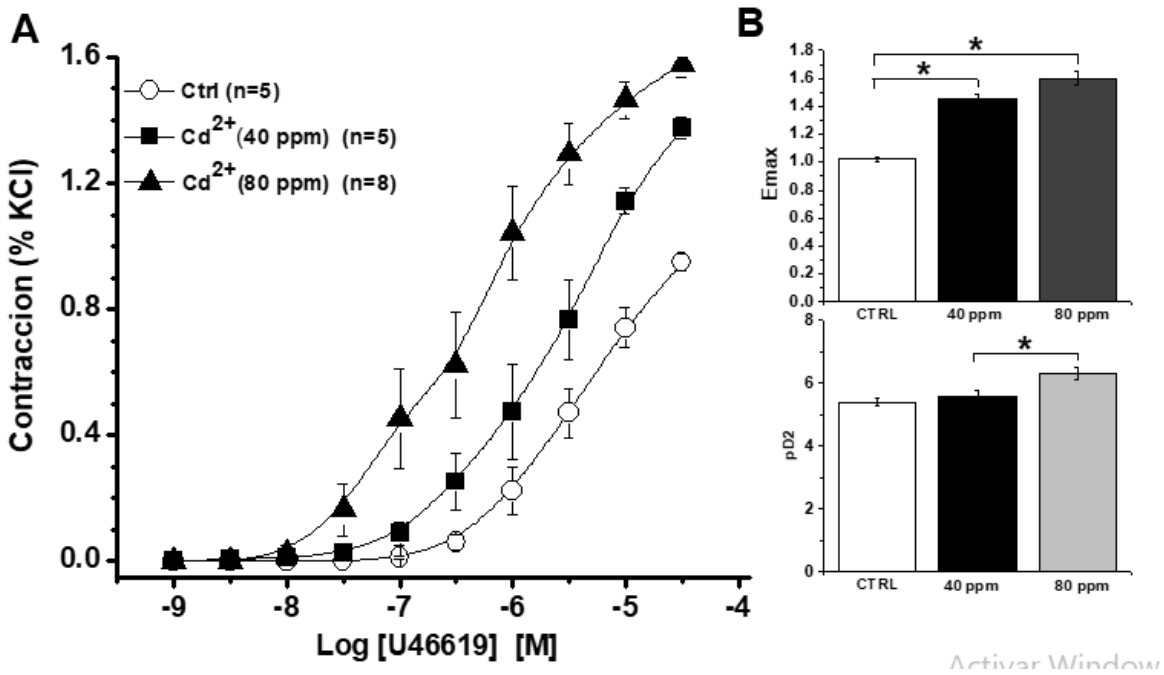


Figura 30. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a U46619 durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a 5-HT; se observa que la Apo disminuye la respuesta contráctil en los grupos tratados con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

El incremento de la respuesta contráctil a U46619 fue analizada en presencia de Apo; se observó una disminución significativa de la respuesta contráctil en el grupo 40 y 80 ppm de Cd^{2+} **(Figura 31A y 32A).** El Emax para el grupo Ctrl fue de 1.02 ± 0.02, el grupo Ctrl/Apo 0.98 ± 0.07 y en preparaciones del grupo Cd^{2+} (40 y 80 ppm) en presencia de Apo fue de 1.09 ± 0.08 y 1.2 ± 0.07. No se observarón cambios significativos en los valores de pD2 entre el grupo 40 y 80 ppm de Cd^{2+}. El valor obtenido para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 0.13, el grupo Ctrl /Apo 5.4 ± 0.09; mientras que para el grupo de Cd^{2+} (40 ppm) fue 5.3 ± 0.06 y el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 5.8 ± 0.2 **(Figura 31B y 32B).**

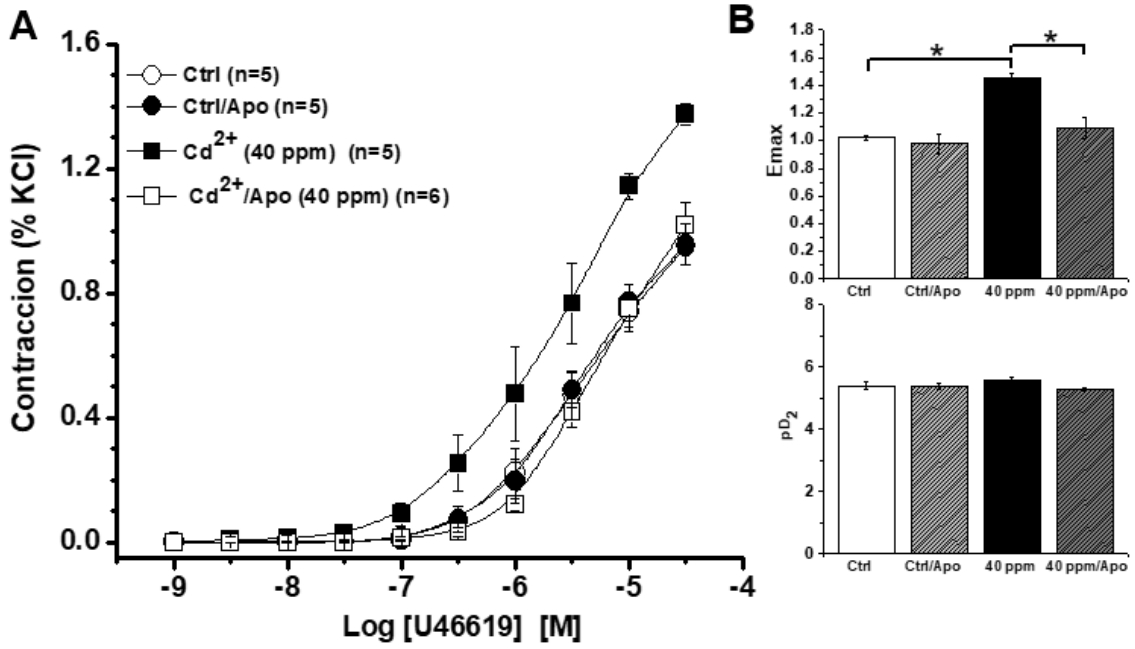


Figura 31. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a U46619 durante la HAS generada por cadmio en anillos de aorta. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a U46619; se observa que la APO disminuye la respuesta contráctil en los grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

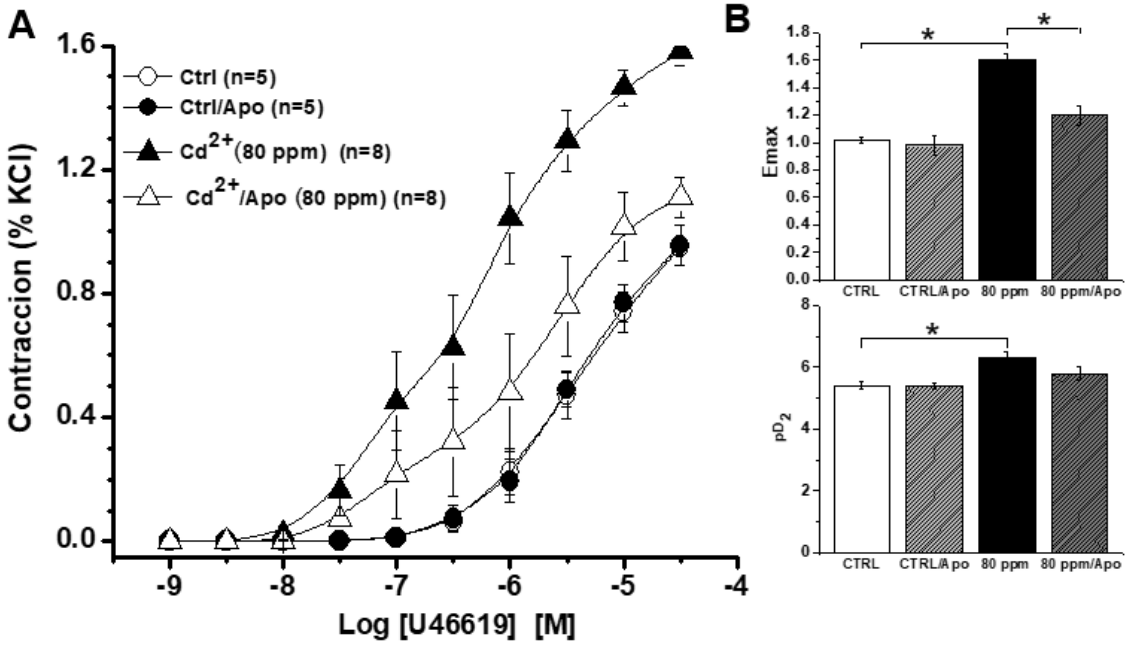


Figura 32. Participación de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta contráctil a U46619 durante la HAS generada por cadmio. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a U46619; se observa que la APO disminuye la respuesta contráctil los grupos tratados con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B**. Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratado con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.2.6 Evaluación de la respuesta relajante en lecho mesentérico de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas

El análisis de las curvas concentración respuesta indicó la presencia de disfunción endotelial, es decir el Cd^{2+} induce una disminución en el efecto relajante mediado por NO e inducido por ACh. El Emax del grupo Ctrl fue de 0.77 ± 0.03, mientras que en el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 0.53 ± 0.02 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.44 ±0.03 **(Figura 33A).** No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 obtenidos en los grupos con Cd^{2+} con respecto al Ctrl, sin embargo se observó diferencia significativa en la pD2 del grupo 40 ppm vs 80 ppm de Cd^{2+}. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 6.4 ± 0.1, para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 6.0 ±0.2 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 6.7 ± 0.1 **(Figura 33B).**

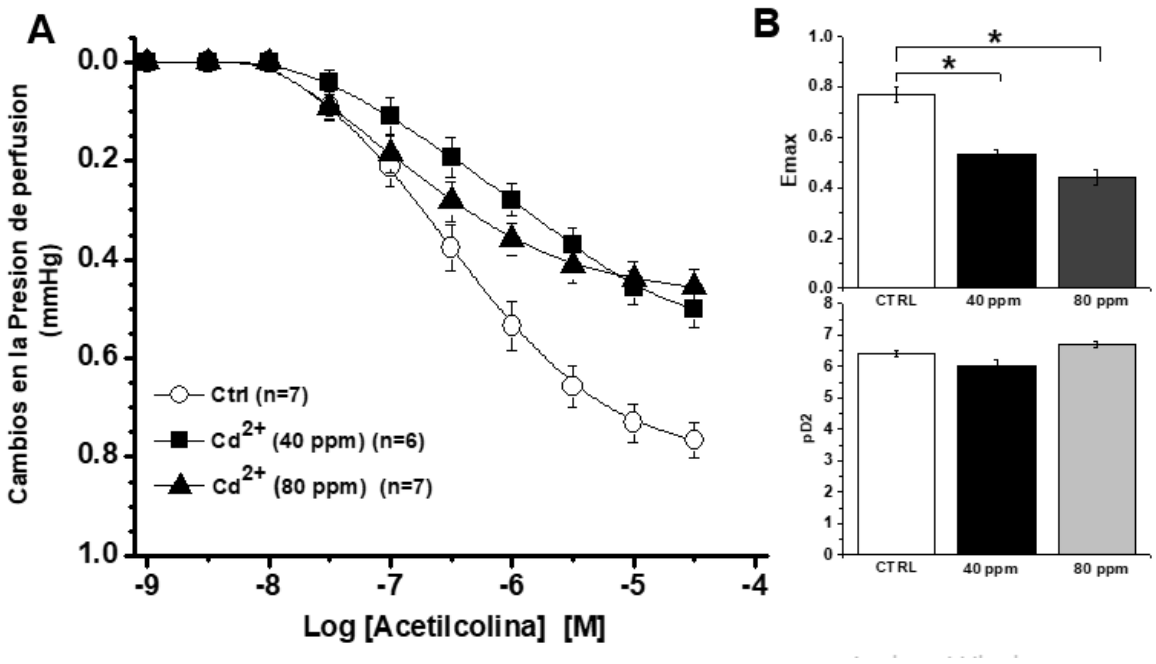


Figura 33. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en lecho mesentérico. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de ACh; se observa una disminución de la respuesta vasodilatadora a ACh en los grupos tratados con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.2.7 Efecto de la fenilefrina en lecho mesentérico de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas

El análisis de las curvas concentración dosis respuesta indicó que el Cd^{2+} no induce un incremento en el Emax de la respuesta contráctil a fenilefrina en el grupo 40 y 80 ppm de Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl; **(Figura 34A).** El Emax del grupo Ctrl fue de 78.6 ± 5.8, mientras que en el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 117 ± 3.3 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 122 ±2.6. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 para los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 5.1 ± 0.06, mientras que para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 5.3 ± 0.06 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 5.4 ± 0.04 (**Figura 34B).**

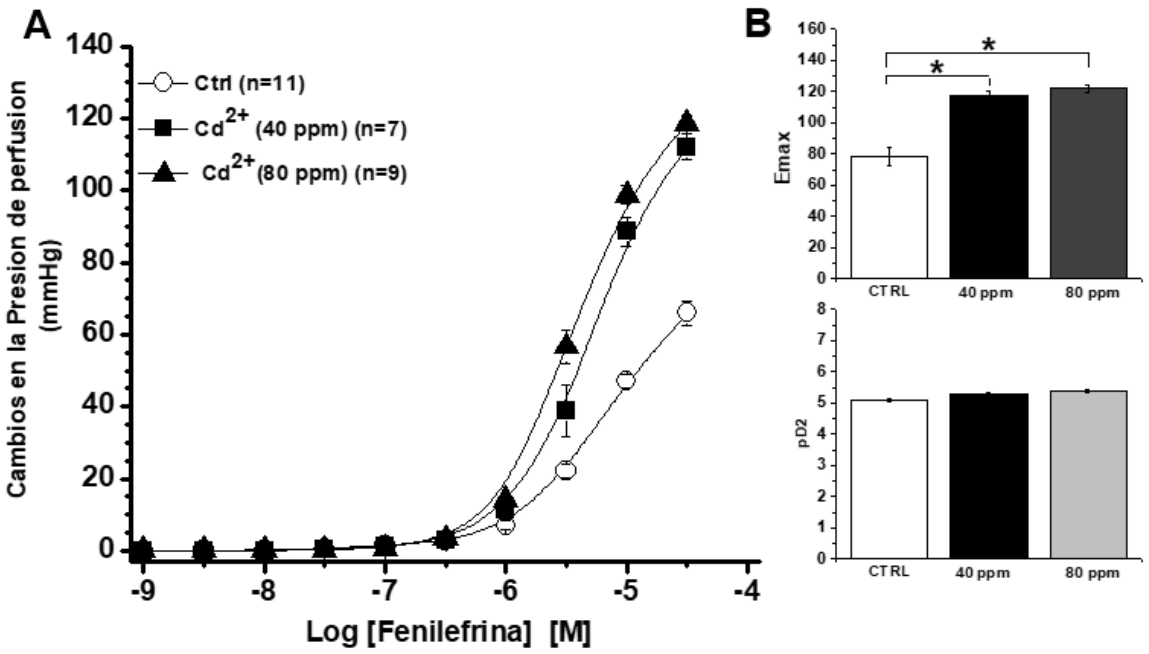


Figura 34. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina lecho mesentérico. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a fenilefrina; se observa un incremento de la respuesta contráctil en los grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.2.8 Efecto de la 5-HT en lecho mesentérico de ratas con hipertensión generada por la exposición crónica a cadmio a una exposición de 8 semanas

El análisis de las curvas concentración dosis respuesta indicó que el Cd^{2+} induce un incremento del Emax de la respuesta contráctil a 5-HT en el grupo 40 y 80 ppm de Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl **(Figura 35A).** El Emax del grupo Ctrl fue de 80 ± 3.9, mientras que en el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 129 ± 5.4 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 135 ± 2.06. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 de los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 6.8, mientras que para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 5.3 ± 0.09 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 5.5 ± 0.12 **(Figura 35B).**

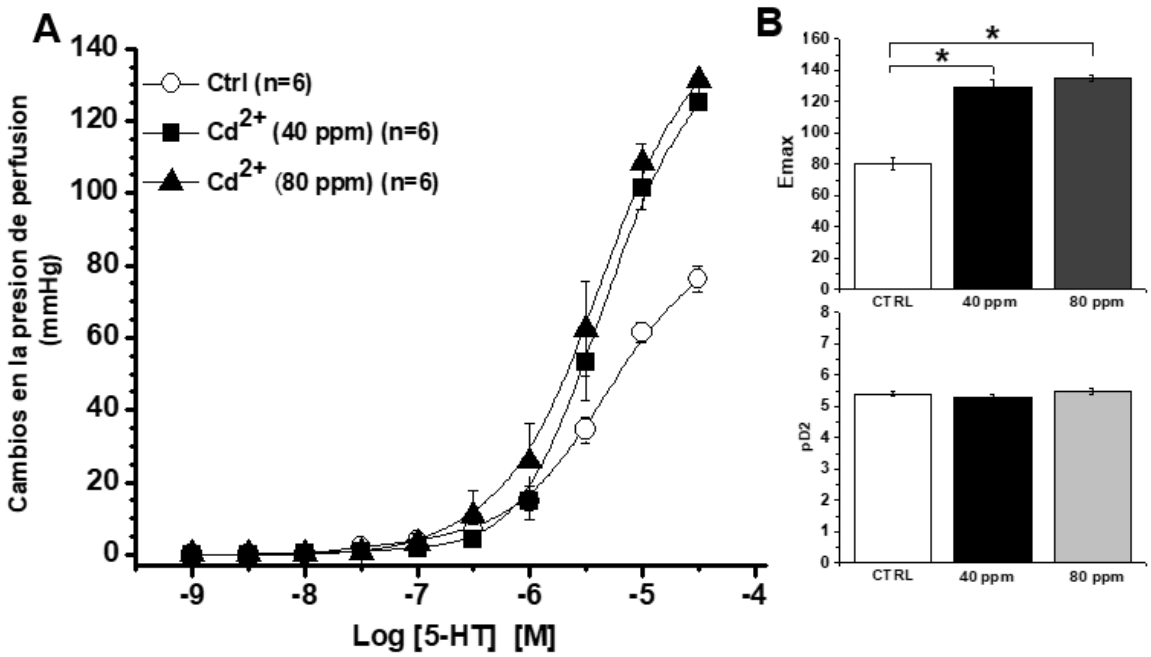


Figura 35. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a 5-HT lecho mesentérico. En el **Panel A** se muestran curvas concentración-respuestas acumulativas a 5-HT; se observa un incremento de la respuesta contráctil en los grupo tratado con Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos tratados con Cd^{2+} y Ctrl. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.2.9 Efecto de la administración crónica de cadmio sobre los niveles de MDA y 4-HDA en aorta y lecho mesentérico de rata

En esta serie experimental se observó que el cadmio induce un incremento del EO en aorta y lecho mesentérico. De acuerdo a los resultados de los experimentos realizados en este

estudio, se observó un incremento en las concentraciones de MDA y 4-HDA en el grupo de Cd^{2+} (40 y 80 ppm) de Cd^{2+} con respecto al grupo Ctrl en aorta y lecho mesentérico. Además, se observó que las concentraciones de MDA y 4-HDA para ambos tejidos son dependientes de la dosis y el tiempo de exposición a cadmio para ambos tejidos.

Los valores de MDA en aorta fueron los siguientes, para el grupo Ctrl fue de 0.034 ± 0.005, mientras para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 0.12 ± 0.003 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.18 ± 0.001. Los valores de las concentraciones de MDA para el lecho mesentérico para el grupo Ctrl fue de 0.046 ± 0.006, mientras que para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 0.15 ± 0.01 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.21 ± 0.004 **(Figura 36A y 36B).**

Los resultados obtenido para la determinación de las concentraciones de 4-HDA en aorta y lecho mesentérico son las siguientes: los valores para el grupo Ctrl fue de 0.023 ± 0.002, mientras que para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 0.065 ± 0.007 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.14 ± 0.001. Mientras que los valores de las concentraciones de 4-HDA para el lecho mesentérico para el grupo Ctrl fue de 0.043 ± 0.005, para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 0.088 ± 0.008 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.19 ± 0.01 **(Figura 37A y 37B).**

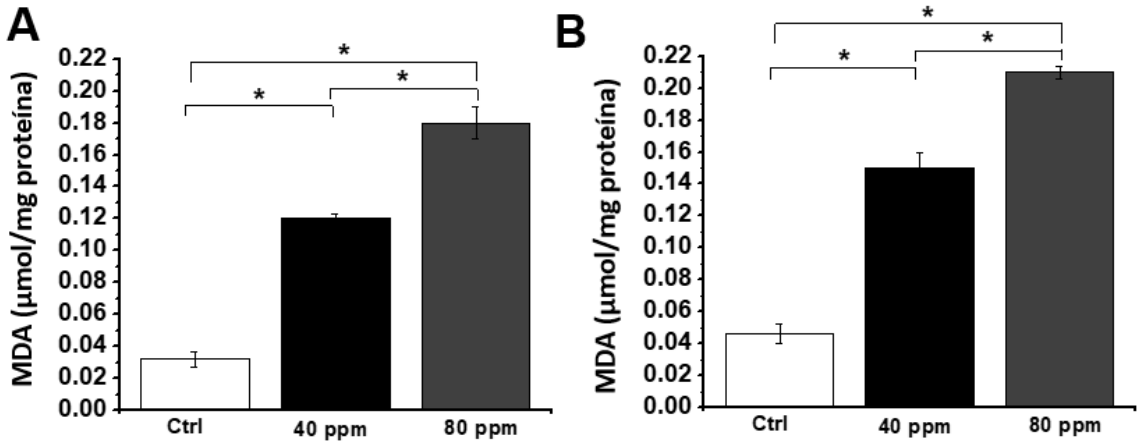


Figura 36. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre los niveles de MDA en aorta y lecho mesentérico de rata. En el **panel A** representación gráfica de las concentraciones de MDA de los grupos con Cd^{2+} (40 y 80 ppm) y grupo Ctrl obtenidos en aorta. **Panel B.** Representación gráfica de las concentraciones de MDA de los grupos con Cd^{2+} (40 y 80 ppm) y grupo Ctrl obtenidos en lecho mesentérico (n=5). Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

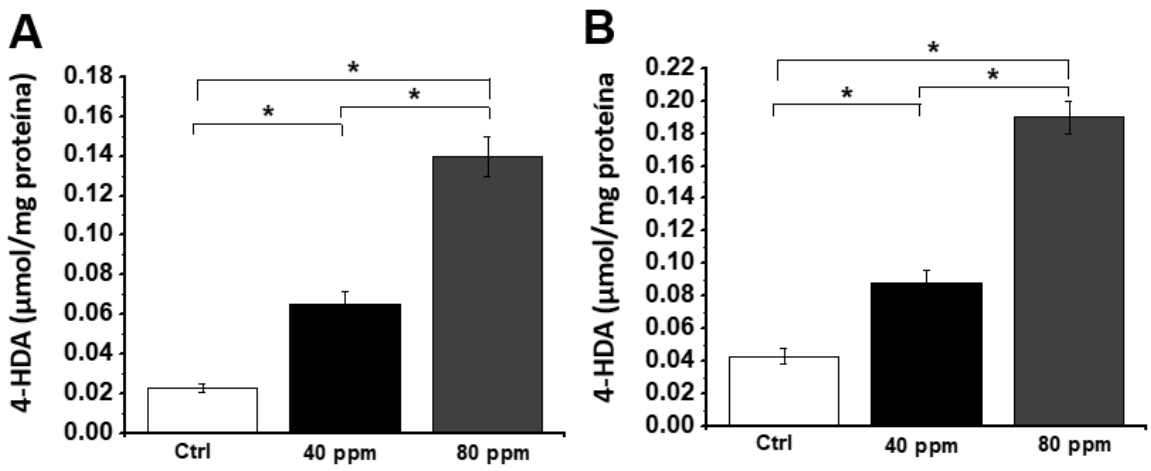


Figura 37. Efecto de la administración crónica de cadmio en los niveles de 4-HDA en aorta y lecho mesentérico de rata. En el **panel A** representación gráfica de las concentraciones de 4-HDA de los grupos con Cd^{2+} (40 y 80 ppm) y grupo Ctrl obtenidos en aorta. **Panel B.** Representación gráfica de las concentraciones de 4-HDA de los grupos con Cd^{2+} (40 y 80 ppm) y grupo Ctrl obtenidos en lecho mesentérico (n=5). Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de actividad enzimática demostraron que en la exposición de cadmio por 8 semanas a una concentración de 40 ppm aumenta la actividad de la GPx significativamente con respecto al grupo Ctrl en aorta y lecho mesentérico, sin embargo a una concentración de 80 ppm de cadmio disminuyó significativamente la actividad enzimática de la GPx con respecto al grupo Ctrl.

La actividad enzimática de GPx para el grupo Ctrl fue de 263.7 ± 8.5, mientras para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 349.2 ± 6.3 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 102.8 ± 5.6. Los valores de las concentraciones de actividad enzimática de GPx para el lecho mesentérico fueron los siguientes; para el grupo Ctr fue de 187.9 ± 12, mientras que para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 316.6 ± 11 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 117.5 ± 8.2 **(Figura 38A y 38B).**

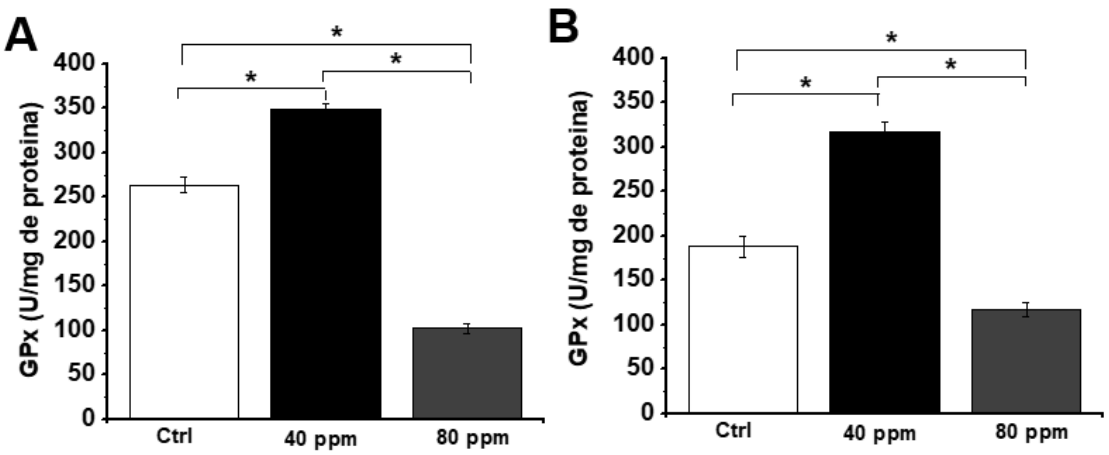


Figura 38. Efecto de la administración crónica de cadmio sobre la actividad enzimática de GPx en aorta y lecho mesentérico de rata. En el **panel A** representación gráfica de la actividad enzimática de GPx de los grupos con Cd^{2+} (40 y 80 ppm) y grupo Ctrl obtenidos en aorta. **Panel B.** Representación gráfica de la actividad enzimática de GPx de los grupos con Cd^{2+} (40 y 80 ppm) y grupo Ctrl obtenidos en lecho mesentérico (n=5). Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

En los resultados obtenidos en la determinación de actividad enzimática de GR, se observó que su actividad a las 8 semanas de exposición de cadmio tanto en aorta como en lecho mesentérico a una concentración de 40 y 80 ppm disminuyo significativamente con respecto al grupo control. Se observó que dicho efecto es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, es decir, que la actividad de la GR presenta una disminución de la actividad enzimática a mayor concentración y tiempo de exposición de cadmio en ambos tejidos.

La actividad enzimática de GR para el grupo Ctrl fue de 0.87 ± 0.03, mientras para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 0.67 ± 0.02 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.38 ± 0.02. Los valores de las concentraciones de actividad enzimática para GR para el lecho mesentérico para el grupo Ctrl fue de 0.99 ± 0.04, mientras que para el grupo Cd^{2+} (40 ppm) fue de 0.66 ± 0.03 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.32 ± 0.04 **(Figura 39A y 39B).**

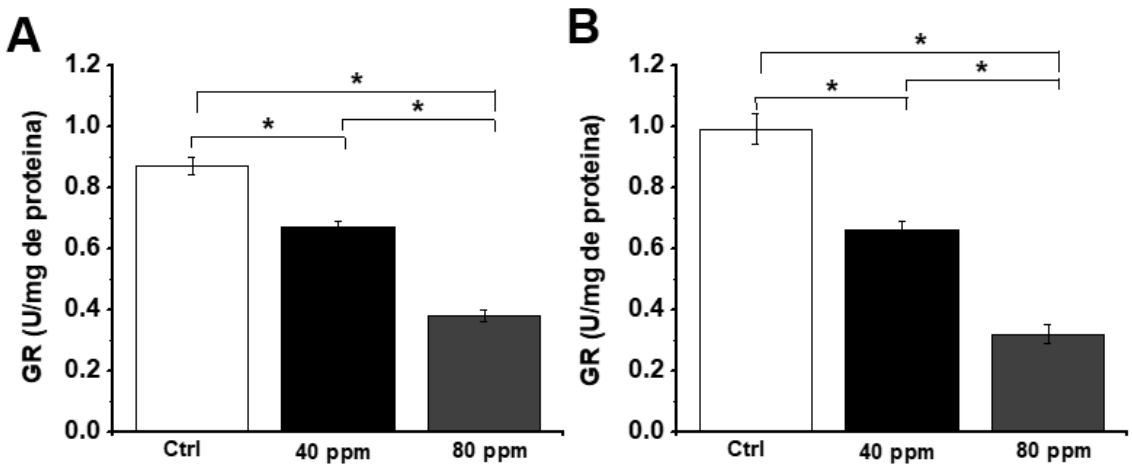


Figura 39. Efecto de la administración crónica de cadmio sobre la actividad enzimática de GR en aorta y lecho mesentérico de rata. En el **panel A** representación gráfica de la actividad enzimática de GR de los grupos con Cd^{2+} (40 y 80 ppm) y grupo Ctrl obtenidos en aorta. **Panel B.** Representación gráfica de la actividad enzimática de GR de los grupos con Cd^{2+} (40 y 80 ppm) y grupo Ctrl obtenidos en lecho mesentérico (n=5). Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una P≤ 0.05.

7.3 Resultados obtenidos con el modelo de intoxicación crónica de cadmio y tratamiento in vivo de apocinina

7.3.1 Características generales del modelo de administración *in vivo* de apocinina durante la exposición crónica a cadmio

Al término de las 8 semanas de la fase experimental no se encontró diferencias significativas en el peso corporal y glucosa sanguínea para el grupo de Cd^{2+}-Apo (80 ppm) con respecto al grupo Ctrl, respectivamente **(Tabla 5).**

	Peso (g.)		Glucosa (mg/dL)	
Semana	**0**	**8**	**0**	**8**
Ctrl-Apo	231.3 ±5.7	412.5 ±7.1	94.7 ±2.2	95.5 ±3.9
Cd^{2+} (80 ppm)	227.3 ±3.7	379.3 ±9.6*	97.8 ±1.06	115.5 ±1.08*
Cd^{2+}-Apo (80 ppm)	237.3 ±5.7	370.3 ±7.6*	97.8 ±1.3	101.5 ±3.7

Tabla 5. Efecto de la administración *in vivo* de Apo sobre los valores de peso corporal y glucosa sanguínea. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una P≤ 0.05 vs Ctrl.

El análisis de los valores de presión arterial indicó que la administración *in vivo* de Apo revierte el aumento de la presión arterial sistólica en el grupo Cd^{2+} (80 ppm) **(Figura 40A).** El valor de presión arterial sistólica para el grupo Ctrl fue de 110.3 ± 5.2; para el grupo

Cd^{2+} (80 ppm) fue de 143.2 ± 2.93 mmHg, mientras que para el grupo Ctrl-Apo fue de 115 ± 2.9 y para el grupo Cd^{2+}-Apo (80 ppm) fue de 114.8 ± 3.04 mmHg.

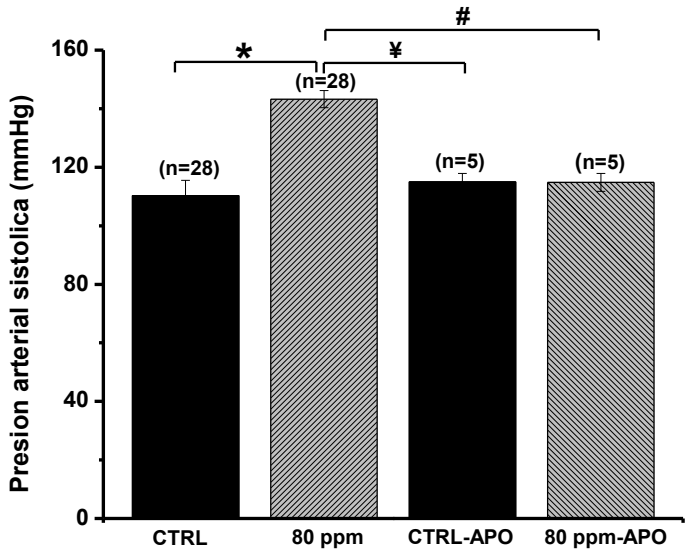


Figura 40. Efecto de la administración in vivo de Apo en ratas con hipertensión arterial inducida por cadmio. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una P≤ 0.05 vs Ctrl; ($^{\#}$) P≤ 0.05 vs Ctrl-Apo; ($^{¥}$) P≤ 0.05 vs Cd^{2+}-Apo.

7.3.2 Efecto de la administración *in vivo* de Apo sobre la disfunción endotelial en aorta de ratas con hipertensión arterial inducida por cadmio a una exposición crónica de 8 semanas.

En resultados anteriores se observó que el cadmio disminuye el efecto relajante mediado por NO e inducido por ACh en el grupo Cd^{2+} (80 ppm) con respecto al grupo Ctrl; indicador de la presencia de disfunción endotelial. En esta serie experimental el análisis de las curvas concentración respuesta mostro que la administración *in vivo* de APO revierte la disfunción endotelial. El Emax del efecto relajante de ACh para el grupo Ctrl fue de 0.80 ± 0.03 y para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 0.48 ± 0.05, mientras que la Emax para el grupo Ctrl-Apo y Cd^{2+}-Apo (80 ppm) fue de 0.75 ± 0.03 y 0.70 ± 0.03 respectivamente (**Figura 41A).** Se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 para el grupo Ctrl vs Ctrl-Apo y el grupo Cd^{2+} (80 ppm) vs Cd^{2+}-Apo (80 ppm). La pD2 para el grupo Ctrl fue de 6.7 ± 0.09, para el grupo Ctrl-Apo fue de 7.3 ± 0.09, para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 6.5 ± 0.13, mientras que para el grupo Cd^{2+}-Apo (80 ppm) fue de 7.4 ± 0.10 (**Figura 41B).**

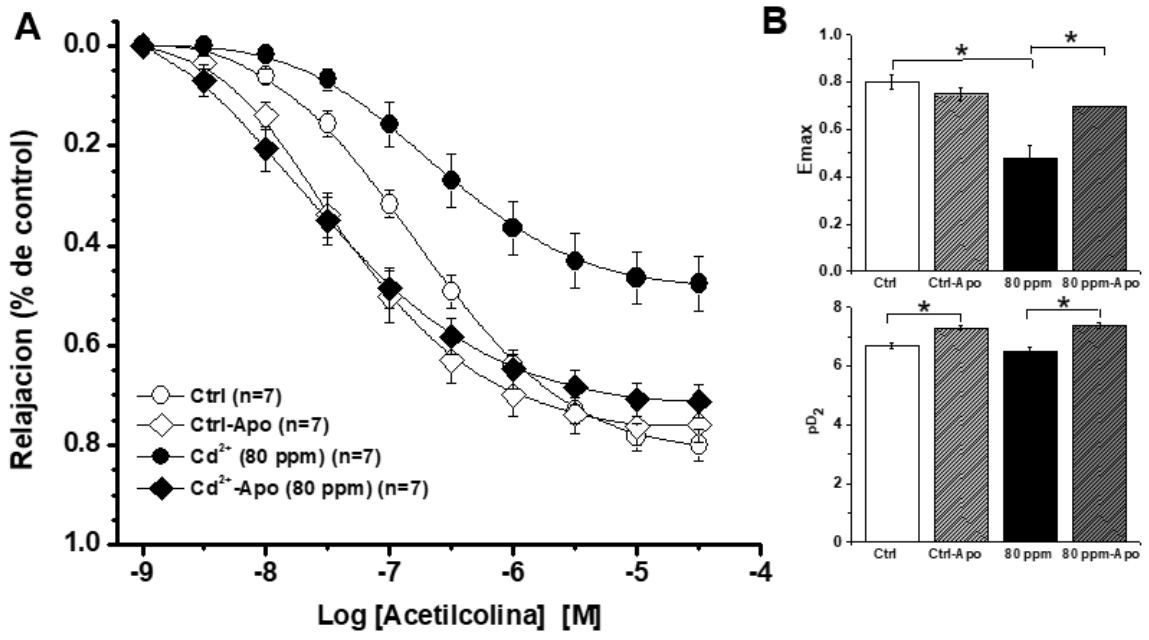


Figura 41. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a ACh en aorta de ratas con administración *in vivo* de Apo. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de ACh; se observa que la administración *in vivo* de Apo revierte la disfunción endotelial presente en el grupo tratado con Cd^{2+}. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos Cd^{2+} y Ctrl con y sin administración *in vivo* de Apo. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

7.3.3 Efecto de la administración *in vivo* de Apo sobre la respuesta contráctil de fenilefrina en anillos de aorta de ratas con hipertensión arterial inducida con cadmio

El análisis de las curvas concentración dosis respuesta indicó que la administración *in vivo* de Apo revierte la hipercontracción de fenilefrina del grupo Cd^{2+} (80 ppm). El Emax del grupo Ctrl fue de 1.08 ±0.01, para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 1.26 ±0.02, mientras que el Emax para el grupo Ctrl-Apo y Cd^{2+}-Apo (80 ppm) fue de 0.90 ±0.05 y 0.94 ±0.07 respectivamente (**Figura 42A).** No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 para los grupos de estudio. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 7.0 ±0.07, para el grupo Ctrl-Apo fue de 6.6 ±0.12, para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 7.1 ±0.05, mientras que para el grupo Cd^{2+}-Apo (80 ppm) fue de 7.0 ±0.10 (**Figura 42B).**

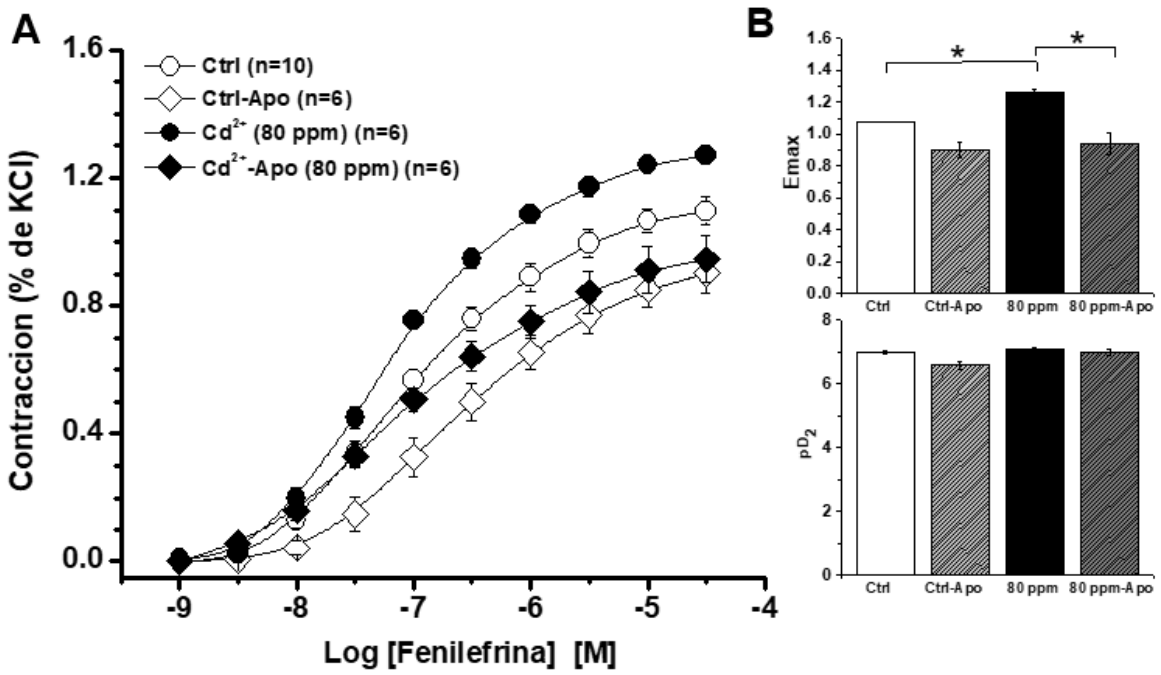


Figura 42. Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en aorta de ratas con administración *in vivo* de Apo. En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de fenilefrina; se observa que la administración *in vivo* de Apo revierte la hipercontracción presente en el grupo tratado con Cd^{2+}. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos Cd^{2+} y Ctrl con y sin administración *in vivo* de Apo. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una P≤ 0.05.

7.3.4 Efecto de la administración *in vivo* de Apo sobre la respuesta contráctil de 5-HT en anillos de aorta de ratas con hipertensión arterial inducida con cadmio

El análisis de las curvas concentración dosis respuesta indicó que la administración *in vivo* de Apo disminuye la hipercontracción de 5-HT del grupo Cd^{2+} (80 ppm). El Emax del grupo Ctrl fue de 1.12 ± 0.04, para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 1.54 ± 0.01 y el Emax para el grupo Ctrl-Apo y grupo Cd^{2+}-Apo (80 ppm) fue de 1.05 ± 0.01 y 1.04 ± 0.04 respectivamente (**Figura 43A)**. No se observaron cambios significativos entre los valores de la pD2 de los grupos estudiados. La pD2 para el grupo Ctrl fue de 5.4 ± 0.03, para el grupo Ctrl-Apo fue de 5.5 ± 0.06, para el grupo Cd^{2+} (80 ppm) fue de 5.7 ± 0.01, mientras que para el grupo Cd^{2+}-Apo (80 ppm) fue de 5.4 ± 0.08 (**Figura 43B).**

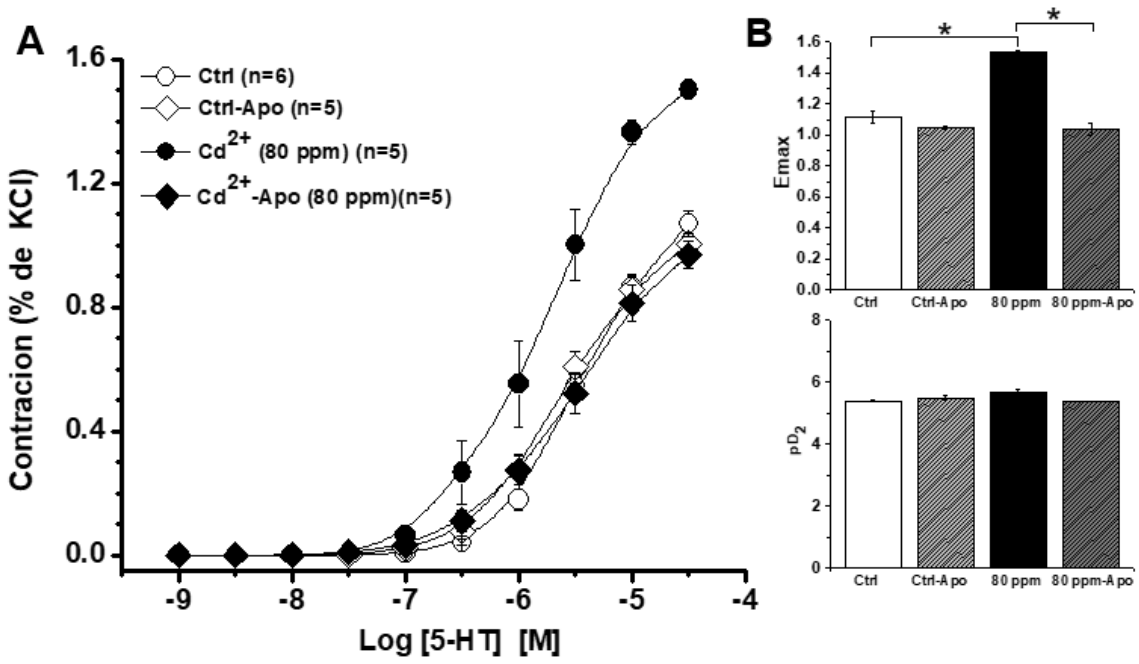


Figura 43. **Efecto de la exposición crónica de cadmio sobre las curvas concentración respuesta a 5-HT en aorta de ratas con administración *in vivo* de Apo.** En el **panel A** se muestran curvas concentración-respuesta acumulativa de 5-HT; se observa que la administración *in vivo* de Apo revierte la hipercontracción presente en el grupo tratado con Cd^{2+}. **Panel B.** Representación gráfica de los valores de Emax y pD2 para los grupos Cd^{2+} y Ctrl con y sin administración *in vivo* de Apo. Los resultados se presentan como la media ± EEM. El (*) indica diferencia significativa con una $P \leq 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral discutiremos los resultados obtenidos en las dos formas de intoxicación por cadmio; el modelo agudo y el modelo crónico, a fin de evaluar los cambios de presión arterial como lo han descrito algunos grupos de investigación. También discutiremos, los resultados que indican que el incremento de la presión arterial está vinculado a la disfunción endotelial por medio de dos maniobras experimentales; a través de la liberación de NO endotelial (CDR a ACh) y por medio del aumento del tono vascular resultado de la estimulación de la pared vascular con fenilefrina, 5-HT y un análogo de Tromboxano A_2. Además discutiremos los resultados derivados de la evaluación de la función endotelial con la incubación con apocinina (con un inhibidor competitivo de la NADP(H) oxidasa) a fin de ponderar la participación de esta enzima en el incremento de la disfunción endotelial inducida por la intoxicación por cadmio. Puesto que nuestra hipótesis menciona que la NADP(H) oxidasa incrementa los radicales superóxido, discutiremos los resultados de la evaluación del estatus oxidativo a través de los cambios de los marcadores de lipoperoxidación (MDA y 4-HDA) y de la actividad de la GPx y GR.

Al final de la presente discusión, describiremos una serie de experimentos que decidimos realizar y priorizar en base a los datos iniciales que obtuvimos *in vitro*. Puesto que en el apartado de los resultados mencionamos que la incubación con apocinina 15 minutos (*in vitro*), evita la disfunción endotelial inducida por el tratamiento crónico de cadmio, decidimos incluir un tratamiento de apocinina *in vivo* con el fin de explorar el efecto beneficioso del inhibidor de la NADP(H) oxidasa sobre la hipertensión arterial y la disfunción endotelial inducida por la intoxicación crónica por cadmio.

8.1 Intoxicación aguda con cadmio.

Con relación a los resultados de la administración aguda de cadmio, no se observaron cambios en presión arterial sistémica. Aún no hay un consenso sobre el incremento de la presión arterial inducida por cadmio en modelos agudos, puesto que en un modelo agudo de intoxicación con cadmio (0.32 mg/Kg por vía intravenosa) se encontró un incremento aproximado de 20% de la presión arterial sistólica (Broseghini y cols., 2015), mientras que en un modelo semejante (4 mg/Kg por vía intravenosa) se encontró una disminución de

aproximadamente de un 30% de la presión arterial, pero solo de forma transitoria (en 5 min), mientras que con el doble de la dosis (8 mg/Kg por via intravenosa), el cadmio redujo hasta un 100% de la presión arterial (Shu-Mi y cols., 2019). Por otra parte, se ha encontrado que la administración de cadmio a dosis intermedias con respecto a los resultados descritos anteriormente (0.32, 1.0, 3.2 mg/kg por via intravenosa) se presenta un efecto bifásico, es decir en un inicio una reducción de presión y posteriormente un incremento (Puri, 1999).

Para relacionar los cambios de presión arterial con los cambios en la función endotelial evaluamos la relajación a Ach y la contracción a agonistas como la fenilefrina o 5-HT. No encontramos que la administración aguda de cadmio diera lugar a una disfunción endotelial (en preparaciones de aorta, ni en lecho mesentérico), este hecho está en concordancia a la ausencia de cambios en la presión sistólica del tratamiento agudo de cadmio (0.25 ppm por via intraperitonial en un periodo de 24 horas). Este hallazgo es semejante a los encontrados por Angely y cols., (2013), Takachi y cols., (2004) y Vasallo y col., (2018) que en un modelo de intoxicación aguda de cadmio (incubación de 10 micromolar por 45 minutos o 24 horas) no encontraron cambios en la curva dosis-respuesta a ACh. Sin embargo, Angely y cols., (2013), Takachi y cols., (2004) si encontraron una hipercontracción a fenilefrina en este modelo. De manera semejante Sakurada y Wakabayashi (1999) encontraron que la 5-HT (incubación de 10 micromolar por 24 horas de cadmio) indujo una hipercontracción. Este último dato no concuerda con nuestro resultado con serotonina.

Con lo anteriormente expuesto, podemos mencionar que en nuestras condiciones experimentales el cadmio no induce incremento de la presión arterial, ni disfunción endotelial. También podemos mencionar que el efecto del cadmio sobre la presión arterial y función endotelial es dependiente del modelo de experimental, dosis y tiempo de intoxicación por este metal.

8.2 Intoxicación crónica con cadmio.

Los resultados obtenidos con el modelo crónico demostraron que en estas condiciones el cadmio tiende a una disminución en la ganancia de peso y un ligero, pero significativo aumento de los valores de glucosa sanguínea (a diferencia de administración aguda de cadmio que no se observaron cambios en el peso, ni en la glucosa sanguínea). Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura (Satarug y cols., 2009; Almenara y cols., 2013). En la presente tesis no realizamos experimentos a fin de encontrar el posible mecanismo de la pérdida de peso en nuestro modelo experimental, por lo tanto solo mencionaremos las propuestas de la bibliografía. La disminución en la ganancia de peso puede explicarse por el daño a nivel intestinal, que conduce a la disminución en la absorción de nutrientes; debido a que el cadmio es transportado a través de transportadores divalentes de metales hacia los enterocitos donde este metal es acumulado provocando la disfunción celular (Jung y cols., 2002). Otro posible mecanismo que explica la disminución de peso es la pérdida de proteínas de bajo peso molecular principalmente (beta-2 microalbuminuria, proteínas unidas al retinol, inmunoglobulinas de cadena corta, además de enzimas como lisozima, N-acetil-β-D-glucosaminidasa y ribonucleasa) consecuencia del daño renal generado por la acumulación de cadmio (Bernard, 2004; RJärup y cols., 2002; Noonan y cols., 2002).

En relación a los datos obtenidos sobre los valores de glucosa concuerdan con lo reportado por diversos estudios en modelos animales en los cuales han mostrado que la exposición a cadmio puede causar hiperglucemia. No fue objetivo de la presente tesis realizar experimentos a fin de encontrar el posible mecanismo de la hiperglucemia, pero los datos encontrados de glucosa en nuestro estudio se pueden explicar de la siguiente manera; el cadmio produce daños a las células β pancreáticas, produciendo una disminución de la liberación de insulina (Chang y cols., 2013). Además, se ha observado que el transportador de glucosa tipo 4; transportador principal en la recaptación de glucosa en las células musculares y adipocitos es afectado negativamente en su expresión ante la exposición del metal; la falta de captación de glucosa por estos tejidos puede producir la aparición de tolerancia alterada a la glucosa y un desequilibrio de la homeostasis de lípidos (Han y cols., 2003). Recientemente, Treviño y cols., (2015) demostraron que el tratamiento crónico de

cadmio (32.5 ppm en el agua de bebida por dos meses) indujo una reducción en la sensibilidad a la insulina, así como un incremento de la resistencia a la insulina. Estos resultados podrían explicar el incremento significativo de glucosa, además de la disminución de la ganancia de peso en nuestro modelo.

8.2.1 Efecto de la administración crónica de cadmio en la presión arterial sistémica.

Los grupos tratados con cadmio (a las dos dosis administradas) presentaron un incremento en la presión arterial de manera significativa desde la 2ª Semana que coincide con lo descrito por otros autores en modelos de rata y ratón (Almenara y cols., 2013; Kukongviriyapan y cols., 2004) con concentraciones y tiempos de administración semejantes a las utilizadas en nuestro estudio. En humanos el incremento de la presión no implica un estado de hipertensión esencial primaria (GPC., 2017), puesto que la definición incluye una elevación persistente de ≥ 140 mm de Hg. Si tomamos en cuenta esta definición clínica, el grupo que cumplen con esta condición son las ratas tratadas con 80 ppm hasta las 8 semanas. La definición de hipertensión arterial sistémica en modelos animales (rata) no está definida debido a la variedad de formas de inducción de la hipertensión, por ejemplo las ratas SHR y diabéticas con disfunción renal las tiene un valor aproximado de 180 mm de Hg de presión arterial sistólica (Kassan y cols., 2009; Perassa y col., 2016), mientras que las ratas “salt sensitivity” 170 mm de Hg (Watts y cols., 2002; De Miguel y cols., 2010; Brian y cols., 2015). En incremento sostenido de la presión arterial sistólica de las ratas con intoxicación crónica de cadmio alcanzan valores por arriba de 140 mm de Hg (Almenara y cols., 2013; Kukongviriyapan y cols., 2004). Los estudios epidemiológicos refieren un incremento por arriba de 140 mm de Hg de la presión sistólica en pacientes con intoxicación crónica de cadmio (Haiyun y cols., 2016).

Además, también se ha observado un aumento de la presión arterial por la ingesta de cadmio en personas expuestas a este metal (relacionado con el ambiente laboral), de tal forma que es importante que se profundice en la fisiopatología de este problema de salud (Plavnik y cols., 2009; Simic y cols., 2006; Gallagher y cols., 2010; Plaza y cols., 2010; Lukkhananan y cols., 2015).

La hipertensión arterial inducida por la intoxicación crónica de cadmio ha sido atribuida a varios mecanismos, entre los cuales se encuentra un incremento del estatus oxidativo con la consecuente disfunción endotelial (Kukongviriyapan y cols., 2016; Rahimzadeh y cols., 2017). Con el fin de profundizar en el mecanismo de la hipertensión inducida por el tratamiento crónico de cadmio, el presente trabajo de tesis evaluó la función endotelial por medio de la cuantificación del efecto relajante de la ACh y del efecto contráctil de la fenilefrina con procedimientos que otros autores han realizado (Tzotzes y cols., 2007; Yoopan y cols., 2008; Angely y cols., 2013; Almenara y cols., 2013). Pero una particularidad de nuestro trabajo es la evaluación de la función endotelial por medio de la cuantificación del efecto contráctil de la 5-HT y de un análogo de Tromboxano A_2 (U46619) que participan en la vasocontricción de la pared vascular (Keegan y cols., 2000; Thomas BJ and Wanstall., 2003; Félétou y cols., 2009; Lopez y cols., 2011; Kaumann y cols., 2006, García y cols., 2009; Smyth y cols., 2010).

8.2.2 Estudios de reactividad *in Vitro*

Cuantificación del efecto relajante de la ACh. Se ha sugerido que el endotelio vascular es un blanco principal de la toxicidad del cadmio (Prozialeck et al., 2008; Yoopan y cols., 2008] debido a un incremento del EO (Almenara y cols., 2013; Kukongviriyapan y cols., 2004). Con la exposición de 8 semanas de cadmio (40 y 80 ppm) en las aortas y lecho mesentérico observamos una disfunción endotelial, mostrada a través de la disminución de la relajación evocada por ACh. En un modelo de exposición crónica a cadmio induce la presencia de disfunción endotelial caracterizada por la disminución de la respuesta relajante a acetilcolina en anillos aórticos (Yoopan y cols., 2009), que concuerda con los resultados encontrados en este proyecto. Una posible explicación es que el cadmio se puede unir a los grupos tioles (-SH), de los receptores muscarínicos esto conllevaría a disminuir las respuestas inducidas por ACh. Se conoce que los grupos tioles son de gran importancia para la estructura y función de las proteínas. La modificación de estos grupos conduce a la pérdida de actividad proteica (Bandyopadhyay et al., 1997). Por lo tanto, la disminución de las respuestas del receptor muscarínico a ACh en este estudio probablemente se debe a la interacción del cadmio con los grupos tioles de los receptores muscarínicos. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron cambios significativos en la pD2, por lo tanto esta

evidencia farmacodinámica indica que no hay cambios en la sensibilidad de los receptores. Otra propuesta sobre el mecanismo de la disfunción endotelial inducida por intoxicación crónica de cadmio está basada en un incremento del estrés oxidativo (Cuypers y cols 2010; Yves Nzengue y cols., 2007; Obaiah Jamakala and Usha Rani 2016).

Con los agonistas contráctiles observamos que la fenilefrina no promueve un incremento de la respuesta contráctil en los anillos de aorta de ratas tratadas con de 40 ppm de cadmio, pero anillos de aorta de ratas tratadas con de 80 ppm de cadmio este agonista adrenérgico indujo una hipercontracción como reflejo de la disfunción endotelial. Este hecho indicaría que las dosis bajas de cadmio no contribuirían a la hipertensión y que a dosis altas la disfunción endotelial podría contribuir al aumento de presión de cadmio. Los resultados con el lecho mesentérico ratas de las tratadas con de 40 ppm y 80 ppm de cadmio con los agonistas contráctiles encontramos que la fenilefrina y la 5-HT inducen una hipercontracción de forma independiente de la dosis, a diferencia de los anillos aórticos (que presentaron efecto dependiente de la dosis de tratamiento).

Las curvas concentración-respuesta a 5-HT y al agonista de TXA_2 nos indica que el cadmio induce una disfunción endotelial dependiendo de la dosis de tratamiento, por lo tanto la 5-HT y el TXA_2 estarían participando en la hipertensión inducida por exposición crónica de cadmio. A la fecha, no se han reportado efectos de la 5-HT en modelos de exposición crónica a cadmio; sin embargo, se ha reportado en otros tipos de hipertensión a nivel clínico cambios en los niveles séricos de 5-HT en pacientes con HAS e hipertensión pulmonar [Keegan y cols., 2000; Thomas BJ and Wanstall., 2003]. Los resultados observados por TXA_2 mostraron que ambas concentraciones empleadas de cadmio en aorta, inducen un incremento de la respuesta contráctil. Se ha demostrado que los prostanoides regulan el tono vascular. Kelly y cols; (2013) reporta que el efecto del TXA_2 se suma al incremento de la respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de ratas hipertensas inducida por cadmio. Sin embargo no existe información puntual sobre la participación del TXA_2 en la HAS inducida por el cadmio; se ha demostrado que el TXA_2, derivado del ácido araquidónico, estimula la activación y agregación de plaquetas, constricción de los vasos, la proliferación y la mitogénesis de las células del músculo liso vascular teniendo un papel importante en la

regulación del tono vascular durante la hipertensión (Dorn y Becker). A través de la interacción de los receptores prostanoides que se han descrito tanto en células endoteliales como en células del MLV (Breyer y cols., 2001, Alfranca y cols., 2007, Tang y Vanhoutte, 2008) mediante la activación de proteínas G. En este sentido también se ha reportado que la producción y la señalización de los prostanoides se han encontrado incrementada en las células del MLV de arteriales de sujetos con hipertensión y también se ha asociado en diferentes modelos animales con hipertensión inducidos por angiotensina II, SHR e hipertensión pulmonar [Van De Vriese y cols., 2000, Vanhoutte y cols., 2005, 2009, Vanhoutte y Tang, 2008, Feletou y cosl., 2009].

También se ha reportado que el aumento de la producción y la actividad de prostanoides son atribuibles a un incremento en la expresión y/o actividad de las COX (COX-1, COX-2) y al aumento de la producción de ERO. Las ERO son considerados factores contráctiles derivados del endotelio (EDCFs), así como potenciadores / moduladores de las respuestas del tono vascular [Tang et al., 2007, Tang y Vanhoutte, 2010] en arterias hipertensas [Vanhoutte et al., 2005; Tang y Vanhoutte, 2010]. Por lo tanto, los resultados obtenidos hasta el momento indican que además de la noradrenalina (a dosis altas), la 5-HT y el TXA_2 contribuyen al incremento de la presión generada por cadmio. Los resultados de 5-HT y TXA_2 obtenidos se pueden explicar a través de diferentes mecanismos: a un aumento de la expresión de receptores o al aumento de la sensibilidad de receptores. En este trabajo no se realizó la determinación de la expresión de receptores, por lo que, no se puede descartar la posibilidad de que un incremento en la expresión de receptores inducida por el cadmio explique la hiperrrespuesta observada. Por otra parte, los valores de pD_2 obtenidos para ambos grupos de cadmio no presentan diferencias significativas entre los grupos estudiados; lo que indica que no se presentan cambios en la sensibilidad de los receptores involucrados.

8.2.3 Efecto de la incubación de apocinina (inhibidor de la NAD(P)H oxidasa sobre la disfunción endotelial inducida por cadmio

El mecanismo de la disfunción endotelial inducida por intoxicación crónica de cadmio basado en un incremento del EO se ha estudiado en las últimas décadas (Cuypers y cols 2010; Yves N y cols., 2007; Obaiah Jamakala and Usha Rani 2016). Puesto que la NAD(P)H oxidasa es la principal fuente de radicales superóxido en la pared vascular (Lopez-Lopez y cols, 2001; Donpunha y cols., 2009; Noonan y cols., 2002) realizamos las curvas concentración-respuesta en presencia de apocinina con el fin de evaluar la participación de dicha enzima en la disfunción endotelial inducida por cadmio.

Con la exposición de 8 semanas de cadmio (40 y 80 ppm) en las aortas de rata observamos disminución de la relajación evocada por ACh, pero la preparaciones provenientes de ratas tratadas con cadmio que se preincubaron con apocinina no mostraron reducción de la relajación. Por otra parte, con los agonistas contráctiles encontramos que la fenilefrina, la 5-HT y el análogo de tromboxano inducen una hipercontracción, pero las preparaciones provenientes de ratas tratadas con cadmio que se preincubaron con apocinina mostraron un el efecto contráctil semejante a las preparaciones control. Esto indicaría que la disfunción endotelial inducida por cadmio es a través de la participación de la NAD(P)H oxidasa.

En las preparaciones de lecho mesentérico provenientes de ratas tratadas (8 semanas) con cadmio (40 y 80 ppm) mostraron reducción en la relajación a la ACh, pero preparaciones de lecho mesentérico provenientes de ratas tratadas con cadmio que se preincubaron con apocinina no mostraron reducción de la relajación. Además, los resultados con los agonistas contráctiles (Fenilefrina y 5-HT) están en la misma dirección, puesto que preparaciones de lecho mesentérico provenientes de ratas tratadas (8 semanas) con cadmio (40 y 80 ppm) mostraron una hipercontracción, pero las preparaciones de lecho mesentérico provenientes de ratas tratadas con cadmio que se preincubaron con apocinina mostraron un efecto contráctil semejante a las preparaciones control. Esto indicaría que la disfunción endotelial inducida por cadmio es a través de la participación de la NAD(P)H oxidasa.

Esta hipótesis plantea una disminución de la biodisponibilidad de ON por un incremento de EO. La apocinina inhibe a la NAD(P)H oxidasa evita la translocación de las subunidades citosólicas solubles p47phox y p67phox a la membrana, un evento que es esencial para el ensamblaje del complejo funcional NAD(P)H oxidasa. Se ha reportado que la apocinina atenúa la hipertensión en un modelo animal de sal de DOCA y que en ratas Sprague-Dawley expuestas durante 8 semanas a 100 ppm de $CdCl_2$, la administración de apocinina (50 y 100 mg / Kg), causa una reducción significativa en la presión sistólica que había sido incrementada por la presencia de cadmio. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con lo planteado por otros autores.

8.2.4 Inducción del estrés oxidativo y modulación del sistema antioxidante por cadmio

Respecto a los resultados de los experimentos realizados en este estudio, se observó un incremento en las concentraciones de MDA y 4-HDA, tanto en los grupos tratados con cadmio a 40 ppm como a 80 ppm a las 8 semanas con respecto al grupo control en aorta y lecho mesentérico, estableciendo así que en este modelo se generaron radicales libres. Estos incrementos están en correspondencia con el incremento de presión arterial en las condiciones mencionadas, por lo tanto, creemos como otros autores que el incremento del estatus oxidativo participa en la hipertensión arterial sistémica inducida por tratamiento crónico de cadmio.

Estudios recientes han demostrado que el cadmio estimula la producción de radicales libres, potencializando el estrés oxidante celular y dando como resultado el deterioro funcional de las macromoléculas (Messner y cols., 2009; Cuypers y cols., 2010). Se ha reportado que la intoxicación crónica con cadmio causa lipoperoxidación en diversos tejidos tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Ognjanovi et al., 2008; Rikans y Yamano, 2000; Tandon et al., 2003), al generar un incremento de radicales $^{\cdot}OH$, $O_2^{\cdot}$, NO y H_2O_2. (O'brien y Salasinski, 1998), e inducir el agotamiento del GSH celular por interacción con los grupos SH del GSH (Pathak & Khandelwal, 2007; Obianime y Roberts, 2009; Samarghandian et al., 2015). Por otra parte, en un modelo de intoxicación crónica de cadmio (15 ppm por 2 meses, concentración requerida para intoxicar a una rata y lograr concentraciones séricas de cadmio hasta el límite tóxico de acuerdo a la OMS) (Skoczynska y Marttynowicz, 2005), se

observó un incremento del estrés oxidativo atribuido por la unión a grupos sulfidrilos de las proteínas y aunado a una disminución del GSH, aumentan así la lipoperoxidación en la membranas celulares. La inducción de lipoperoxidación fue asociada a un incremento del estrés oxidativo, generado por alteraciones en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, GPx y CAT que constituyen la primera línea de defensa en contra de los radicales $O_2^{\cdot}$ y H_2O_2. También, se observó en el modelo de protección con proteína de soya y caseína, que el incremento del estado oxidativo inducida por Cd fue acompañado por un incremento tanto de actividad como de expresión en el ARNm de las enzimas antioxidantes, sugiriendo una modulación post-transcripcional y post-traduccional como respuesta celular al daño inducido por el cadmio (Oliveira y Batista, 2018).

Por otra parte, se sabe que la lipoperoxidación juega un papel importante en el grado de daño vascular. Recientemente, estudios clínicos de aterosclerosis han sido asociados con el incremento de los niveles de lipoperoxidación (Fabbi et al., 2004), el incremento del estrés oxidativo, y la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes (Ognjanovic et al., 2008; Sinha et al., 2008). Se ha establecido que el cadmio puede remplazar al hierro y unirse a la ferritina, lo que provoca un incremento de iones libres de Fe^{2+} e induce la reacción de Fenton, favoreciendo así el incremento de las EROs y generando un daño en las membranas de las células endoteliales (Flora et al., 2008). La producción de EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) parecen ser un mecanismo relevante de los efectos tóxicos del cadmio en algunos tejidos y órganos, incluyendo el sistema cardiovasculares (Beyersmann and Hartwing, 2008; Waisberg et al., 2003), que pueden ser disminuidos con la presencia de atrapadores de radicales libres (scavengers). El incremento de la producción de EROs por cadmio, puede desencadenar procesos como la lipoperoxidación, daño al ADN y modificación oxidativa de proteínas y enzimas antioxidantes que eventualmente pueden provocar a la disfunción y muerte celular del tejido endotelial (Thévenod, 2009; Valko et al., 2007).

En relación a lo anterior, los resultados obtenidos en las determinaciones de actividad enzimática de este estudio, se observó que la actividad de la GPx a las 8 semanas a la concentración de 40 ppm de cadmio, se observó que la actividad de la GPx aumenta

significativamente con respecto al control en ambos tejidos, pero a la concentración de 80 ppm de cadmio disminuyó significativamente la actividad enzimática de la GPx con respecto al grupo control. Se ha descrito que la primera línea de defensa hacia el $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2, son las enzimas antioxidantes como la SOD, GPx y CAT. Estas enzimas entre otras son reguladas por el factor NF- E2 (Nrf1 y Nrf2), que se unen a los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) y regulan la expresión de los genes de enzimas antioxidantes (Thimmulappa et al., 2002). Se ha descrito que en modelos de estrés oxidativo agudo y en bajas concentraciones el sistema celular responde aumentando la actividad y expresión de las enzimas antioxidantes para contrarrestar el daño celular, sin embargo, cuando la concentración del xenobiótico o el tiempo de exposición se vuelve crónico, el daño celular es tal que ya no se efectúan dichos mecanismos de protección y por lo tanto decae la expresión y actividad del sistema antioxidante enzimático, como lo que se observa en nuestros resultados.

El incremento de estrés oxidativo y disfunción endotelial han sido factores de riesgo para hipertensión y aterosclerosis (Forstermann, 2008). Varios estudios en autopsias han encontrado una asociación entre los niveles de cadmio en tejido y las lesiones ateroscleróticas (Aalbers and Houtman ,1985; Voors et al., 1982). Por otra parte, se sabe que el GSH desempeña un papel crítico en la defensa celular frente a la resistencia oxidativa participando como sustrato de enzimas, como la glutatión-S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR); además el Cd es un contaminante ambiental generalizado que causa disfunción renal, toxicidad hepática, genotoxicidad y efectos apoptóticos dependiendo de la dosis (concentración), la ruta (vía de administración) y la duración (tiempo) de la exposición, por los que su presencia induce diversos mecanismos celulares de estrés oxidativo que conllevan al deterioro celular.

Respecto a los resultados obtenidos en la actividad enzimática de GR, se observó que su actividad a las 8 semanas de exposición de cadmio tanto en aorta como en lecho mesentérico a una concentración de 40 y 80 ppm disminuyó significativamente con respecto al grupo control. Se observó que dicho efecto es concentración dependiente y del tiempo de exposición, es decir, que la actividad de la GR presenta una disminución de la

actividad enzimática a mayor concentración y tiempo de exposición de cadmio en ambos tejidos.

Por lo tanto, se establece que la exposición crónica de cadmio genera lipoperoxidación en aorta y lecho mesentérico de ratas tratadas a concentraciones de 40 y 80 ppm y a tiempos de exposición de 8 semanas, indicado por el incremento de las concentraciones de MDA y 4-HDA, que representan marcadores de la oxidación de lípidos de membrana. Así mismo, se ha descrito que el cadmio reacciona con grupos SH inhibiendo los grupos tioles intracelulares, especialmente del GSH (Pathak & Khandelwal, 2007), depletando el principal antioxidante endógeno. Por lo anterior, el cadmio induce estrés oxidativo celular libre que potencializan la peroxidación lipídica, haciendo un círculo vicioso sin fin. Por lo tanto, y en función a los resultados obtenidos podemos sugerir que el aumento en el estrés oxidativo inducido por cadmio en aorta y lecho mesentérico es establecido por una disminución de las defensas antioxidantes y el aumento en la producción de EROs. Diversos estudios han mostrado que la exposición a cadmio también redujo la actividad de SOD, GPx y CAT en sangre, hígado y riñones de ratas intoxicadas con cadmio. También se demostró que las actividades de GPx y SOD eran significativamente menores en los eritrocitos de los trabajadores expuestos a cadmio sugiriendo un importante efecto oxidativo de este metal y la importante inhibición del sistema antioxidante.

Recientemente, demostraron que la exposición crónica a altas dosis de cadmio en el agua redujo la actividad de las selenoproteínas como GPx en la corteza y el cerebelo de ratones, lo que se atribuyó a la expresión génica reducida de estas enzimas. Además, Zalups et al., (2000) observó que la exposición al cadmio puede reducir las defensas antioxidantes no enzimáticas, como GSH. Por el contrario, en otro estudio con exposición a cadmio, se observó un aumento en GSH, GR y actividad de CAT en eritrocitos de mineros, que han sido atribuidos a mecanismos compensatorios debido a los bajos niveles de exposición o respuestas adaptativas a una intoxicación de metales pesados como el cadmio. La reducción en la actividad de GPx conduce a un aumento en las concentraciones de H_2O_2 y al daño celular que pueden dar como resultado una elevación de la actividad de CAT. En nuestro estudio a la concentración de 80 ppm de cadmio a un tiempo de 8 semanas la actividad de GPx en aorta y lecho mesentérico fueron más bajos en los grupos tratados con

cadmio con respecto al grupo control. La razón de la disminución de la actividad de GPx en animales expuestos a cadmio podría deberse a la formación de complejos Cadmio-selenoproteínas y una disminución en las concentraciones de GSH derivada de la oxidación de sus grupos tioles.

8.3 Estudios de reactividad vascular en un modelo *in Vivo*

Puesto que los resultados obtenidos con preparaciones *in vitro* de las aortas de animales con tratamiento crónico de cadmio muestran la reducción de la disfunción endotelial por la incubación con apocinina (a las 8 semanas y 80 ppm), se realizaron una serie de experimentos en ratas con intoxicación crónica de cadmio acoplado a el tratamiento (*in vivo*) con apocinina.

Con respecto a la presión arterial encontramos que las ratas con intoxicación crónica, pero con tratamiento con apocinina no presentaron hipertensión. Este hallazgo es semejante al encontrado por el Nwokocha y cols., 2013, que lograron una reducción de la presión arterial con el tratamiento con el inhibidor de la NAPH oxidasa de las ratas tratadas con cadmio 100 ppm en el agua de bebida. Desafortunadamente el incremento de presión arterial con el cadmio no es persistente es decir se incrementó la presión a la tercera semana de tratamiento y regresó al nivel basal a las cinco semanas, mientras que la apocinina sola genera una reducción o incremento de la presión arterial dependiendo de la dosis. Nosotros no observamos cambios en la presión arterial con el tratamiento con apocinina sola.

Con la exposición de 8 semanas de cadmio (80 ppm) en las aortas de rata observamos disminución de la relajación evocada por ACh, pero las preparaciones provenientes de ratas tratadas con cadmio pero con el co-tratamiento con apocinina no mostraron reducción de la relajación. Por otra parte, con los agonistas contráctiles encontramos que la fenilefrina y la serotonina inducen una hipercontracción, pero las preparaciones provenientes de ratas tratadas con cadmio pero con el co-tratamiento con apocinina mostraron un efecto contráctil semejante a las preparaciones control. Estos resultados están acorde con los resultados obtenidos con incubación con apocinina in vitro, por lo tanto esto indicaría que la disfunción endotelial inducida por cadmio es a través de la participación de la NAD(P)H

oxidasa con una oportunidad terapéutica. Se ha sugerido que el endotelio vascular es un blanco principal de la toxicidad del cadmio (Prozialeck et al., 2008; Yoopan y cols., 2008] debido a un incremento del estrés oxidativo (Almenara y cols., 2013; Kukongviriyapan y cols., 2004).

En resumen, la intoxicación por ingesta crónica de cadmio induce hipertensión arterial sistémica derivada de una disfunción endotelial. Es el incremento del estrés oxidativo la posible causa de la reducción del efecto relajante del óxido nítrico. Por otra parte, los resultados con la aplicación de apocinina (*in vivo* e *in vitro*) indicarían que la NAD(P)H oxidasa participa en el incremento del estatus oxidativo inducido por el cadmio. Por lo tanto, la inhibición de esta enzima podría ser el mecanismo por el cual la apocinina evita la hipertensión arterial sistémica durante la intoxicación crónica de cadmio

IX CONCLUSIONES

- La intoxicación aguda de cadmio no genera cambios en el peso, glucosa, presión arterial sistémica ni en la función endotelial.
- La administración crónica de cadmio induce hipertensión arterial sistólica a través de la disfunción endotelial generada por un aumento en el estatus oxidativo.
- La disfunción endotelial durante la administración crónica de cadmio está relacionada con la participación con la NAD(P)H oxidasa.
- El tratamiento con Apocinina previene la hipertensión arterial sistémica y la disfunción endotelial que se desarrolla durante la exposición crónica de cadmio.
- La evidencia farmacológica indica que en el mecanismo de la hipertensión arterial y la disfuncon endotelial que se desarrolla durante la exposición crónica de cadmio participa la NADPH (oxidasa).

X. PERSPECTIVAS

1. Cuantificar la concentración de cadmio en sangre y los tejidos.
2. Determinar la actividad y/o expresión de la NADPH oxidasa.
3. Evaluar el estatus oxidativo del modelo crónico de cadmio con el tratamiento con Apocinina.

XI BIBLIOGRAFÍA

Aaronson, P. I. y Ward, J. P. The Cardiovascular System, 2004 2nd ed. Oxford.

Abdel-Latif, A.A. (2001) Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med*; 226(3):153-63.

Abu-Hayyeh S1.,Sian, M., Jones, K.G., Manuel, A. y Powell, J.T. (2001). Cadmium accumulation in aortas of smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 21(5):863-7.

Afridi HI, Kazi TG, Kazi NG, Jamali MK, Arain MB. (2010) Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and non smokers hypertensive patients. *J Human Hypertension* 24: 34–43.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2008) Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Akata, T. (2007). Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca^{2+} mobilization and/or myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J Anesth*; 21(2):232-42.

Almenara, C.P., Gilson, B., Broseghini, F., Marcus, V. A., Jhuli, K. A., IvanitaStefanon, D. V y Vassallo, A. S. (2013). Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta; *PLOS ONE*. 8(7).

Alvarez, Y., Pérez-Girón, J.V., Hernandez, R., Briones, A.M., García-Redondo, A y Beltrán, A. (2007). Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*; 321: 381- 388.

Andrew, P.J y Mayer, B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*; 43(3):521-31.

Angeli, J. K., Cruz Pereira, C.A., De Oliveira, F.T., Stefanon, I., Padilha, A.S y Vassallo, D.V. (2013) Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free Radic Biol Med*; 65:838-48.

Atlas de Histología, Biología Celular y Tisular 2014.

Bachschmid, M., Thurau, S., Zou, M.H y Ullrich, V. (2003) Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. *FASEB J*;17(8):914-6.

Baker, J.R., Edwards, R.J., Lasker, J.M., Moore, M.R y Satarug, S. (2005) Renal and hepatic accumulation of cadmium and lead in the expression of CYP4F2 and CYP2E1. *Toxicol Lett*: 159, 182–191.

Bernard, A. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. (2004). *Biometals*; 17(5):519-23.

Beswick, R.A., Dorrance, A.M., Leite, R. y Webb, R.C. (2001a). NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*; 38(5):1107- 11.

Bisognano, J.D. (2016). Baroreflex activation therapy: future use as therapy for severe or resistant hypertension? *J Am Soc Hypertens*; 1711(16)30284-4.

Bohm, F. y Pernow, J. (2007). The importance of enothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Vasc Res*; 76(1):8-18.

Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M. y Weston, A.H. (2008).EDFH: bringig the conceps together. *Tends Pharmacol*; 23:374-380.

Briones, A.M., Alonso, M.J., Hernanz, R., Miguel, M. y Salaices, M. (2002a). Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*; 39(3):378-88.

Cai H, Harrison DG. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*; 87:840-844.

Chang, K.C., Hsu, C.C., Liu, S.H., Su, C.C., Yen, C.C., Lee, M.J., Chen, K.L., Ho, T.J., Hung, D.Z., Wu, C.C., Lu, T.H., Su, Y.C., Chen, Y.W. y Huang, C.F. (2013). Cadmium induces apoptosis in pancreatic β-cells through a mitochondria-dependent pathway: the role of oxidative stress-mediated c-Jun N-terminal kinase activation. *PLoS One*; 8(2):e54374.

Chatterjee, A. y Catravas, J.D. (2008). Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiolgic regulation. *Vasul Pharmacol*; 49(4-6): 134-140.

Christensen, K.L y Mulvany, M.J. (2001). Location of resistance arteries. *J Vasc Res*; 38:1–12.

Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakke, K., Nair, A.R., Munters, E. y Artois T.J. (2010). Cadmium stress: An oxidative challenge. *Biometals*; 23, 927–940.

Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Kozieradzki, I. y Scanga, S.E. (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*; 20; 417(6891):822-8.

De Miguel., Satarupa, Das., Hayley, Lund. y David, L. (2010).T lymphocytes mediate hypertension and kidney damage in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 298: R1136–R1142.

Donmez, G., Derici, U., Erbas, D., Arinsoy, T., Onk, A., Sindel, S. y Hasanoglu, E. (2002). The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol*; 52(5):435-40

Donpunha, W., Kukongviriyapan, U., Sompamit, K., Pakdeechote, P., Kukongviriyapan, V. y Pannangpetch P. (2011). Protective effect of ascorbic acid on cadmium-induced hypertension and vascular dysfunction in mice. *Biometals*; 24(1):105-15.

Dorn, G.W. y Becker, M.W. (1993). Thromboxane A_2 stimulated signal transduction in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*; 265:447–456.

Eakin, D. J., Schroeder, L. A., Whanger, P. D., & Weswig, P. H. (1980). Cadmium and nickel influence on blood pressure, plasma renin, and tissue mineral concentrations. *American Physiological Society endocrinology and metabolism; 238,* E53–E61.

Feletou, M. y Vanhoutte, P.M. (2006). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 26 (6): 1215-1225.

Félétou, M., Verbeuren, T.J., Vanhoutte, P.M. (2009). Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol*; 156(4):563-74.

Fisiología Humana, Jesús Tresguerres. 3. Ed. McGraw-Hill Interamericana, 2005.

Furchgott, R.F. y Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*; 288:373–376.

Gao, Y.J. y Lee, R.M. (2001). Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol;* 134(8):1639-46.

García-Cohen, E.C., Marin, J., Diez-Picazo, L.D., Baena, A.B., Salaices, M. y Rodriguez-Martinez MA. (2000). Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J Pharmacol Exp Ther*; 293(1):75-8.

García-Redondo, A.B., Briones, A.M., Beltrán, A.E., Alonso, M.J., Simonsen, U. y Salaices, M. (2009b). Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in

resistance arteries through increased thromboxane A_2, Ca^{2+}, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther*; 328(1):19-27.

Gökalp, O., Ozdem, S., Dönmez, S., Dogan, M., Demirin, H., Kara, H.Y. y Delibas, N. (2009). Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in cadmium-hypertensive rats. *Toxicol Ind Health*; 25: 447–453.

Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines.

Guía de Practica Clinica, Hipertesión Arterial. IMSS.

Grau-Perez, M., Pichler, G., Galan-Chilet, I., Briongos-Figuero, L.S, Rentero-Garrido, P., Lopez-Izquierdo, R., Navas-Acien, A., Weaver, V., García-Barrera, T., Gomez-Ariza, J.L, Martín-Escudero, J.C., Chaves, F.J, Redon, J., Tellez-Plaza, M. (2017). Urine cadmium levels and albuminuria in a general population from Spain: A gene-environment interaction analysis. *Environ Int*; 106:27-36.

Graton M.E., Potje, S.R., Troiano J.A., Vale G.T., Perassa, L.A., Nakamune, A., Tirapelli C.R., Bendhack, L.M., Antoniali, C. (2019). Apocynin alters redox signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med*; 134:53-63.

Griendling, K.K. (2004). Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart*; 90(5):491-3.

Griendling, K.K, Sorescu, D., Lassègue, B., Ushio-Fukai M. (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 20(10):2175-83.

Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Graham, D. y Dominiczak, A.F. (2001). Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*; 37(2 Part 2):529-34.

Han, J.C., Park, S.Y., Hah, B.G., Choi, G.H., Kim, Y.K., Kwon, T.H., Kim, E.K., Lachaal, M., Jung, C.Y. y Lee, W. (2003) Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. *Arch Biochem Biophys*; 413(2):213-20.

Hammoud, R.A., Vaccari, C.S., Nagamia, S.H. y Khan, B.V. (2007). Regulation of the renin-angiotensin system in coronary atherosclerosis: a review of the literature. *Vasc Health Risk Manag;* 3(6):937-45.

Harrison, D.G. y Gongora, M.C. (2009). Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am;* 93(3):621-35.

Harrison, D.G. (2009) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest;* 100:2153-2157, 199.

Hirano, K. (2007). Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca^{2+} sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci*; 104(2):109-15

Hirafuji, M., Ebihara, T., Kawahara, F., Hamaue, N., Endo, T. y Minami, M. (2001). Inhibition by docosahexaenoic acid of receptor-mediated Ca2þ influx in rat vascular smooth muscle cells stimulated with 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol*; 427, 195–201.

Hu, Z.W., Kerb, R., Shi, X.Y., Wei-Lavery, T., Hoffman, B.B. (2002). Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*; 303(2):563-7.

Hussain, T., Shukla, G.S. y Chandra, S.V. (1987). Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacol Toxicol*; 60: 355–358.

Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 Informe Final de Resultados. Disponible desde: http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut_mc_2016-310oct.pdf.

Jean-M, M. y Frank, T. (2010). New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *Biometals;* 23:763–768.

Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. The sixth report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. (JNC VI). Arch Intern Med (1997); 157:2413-2446.

Jung, D.P., Nathan, J.C y Curtis, D.K. (2002). Intestinal Absorptipn of cadmiun is Associated with Divalente Metal Transporter 1 in Rats.*Toxicol Sci*; 68(2):288-94.

Kaplan, N.M. «Hipertensión Clínica». Hipertension primaria: Patogenia. p. 56135. Edición en español: Copyrigyt (2003) Waverly Hispánica S.A/S.L.

Kassan, M.J. y Sevilla, M.A. (2009). Chronic treatment with pravastatin prevents early cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*; 158, 541–547.

Kaumann, A.J. y Levy, F.O., (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther*; 111, 674–706.

Kawabe, J., Uschikubi, F. y Hasebe, N. (2010). Prostacyclin in vascular diseases. Recent insight and future perspectives. *Circ J*; 74(5):836-43.

Keegan, L.J., Metais, C., Bianchi, C., y Sellke, F. (2000). Increased pulmonary vascular contraction to serotonin after cardiopulmonary bypass: role of cyclooxygenase. *J Surg Res*; 90:138–143.

Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L.G. y Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*; 59(3):251-87.

Kostenis, E., Milligan, G. y Christopoulos, A. (2005). G-Protein coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*; 111:1806-13.

Kukongviriyapan, U., Pannangpetch, P., Kukongviriyapan, V., Donpunha, W., Sompamit, K. y Surawattanawan, P. (2014). Curcumin protects against cadmium-induced vascular dysfunction, hypertension and tissue cadmium accumulation in mice. Nutrients; 2014; 6(3):1194-208.

Lall, S.B., Peshin, S.S., Gulati, K., Khattar, S., Das, N., y Seth, S.D. (1997). Involvement of rennin-angiotensin system in hypertensive effect of cadmium in rats. *Indian J Exp Biol*; 35, 338–39.

Lasségue, B. y Girendling, K. (2004). Reactive oxygen species in hypertension. *Am. J. Hypertens*. 17:852-860.

Laroia, S.T., Ganti, A.K., Laroia, A.T. y Tendulkar, K.K. (2003). Endothelium and the lipid metabolism: the current understanding. Int. *J. Cardiol*; 88:1-9.

Lawson, K. y Chatelain, P. (1992). Effects of divalent cations nickel and cadmium on contractions of rat aorta to endothelin-1. *J Auton Pharmacol*; 12, 237–243.

Le, B.M., Leslie, S.J., Milliken, P y Megson, I.L. (2008). Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal;* 10(9):1631-74.

Leung, H.S., Leung, F.P., Yao, X., Ko, W.H., Chen, Z.Y., Vanhoutte, P.M. y Huang, Y. (2006). Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery. *Vascul Pharmacol*; 44(5):299-308.

Levick JR. And indtroduction to cardiovascular physiology (Koster J y Ueberbeng Aa EDS), Arnold, London. 2003.

Levy, B.S. y Wegman, D.H. Occupational Health, Recognising and Preventing Work Related Diseases. 2nd Edition. Boston, USA: Little, Brown and Co.1999.

Li, H., Förstermann, U. (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*; 190(3):244-54.

Li, J., Cao, Y.X., Liu, H. y Xu, C.B. (2007). Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium dependent relaxation in hypertension. *Eur J Pharmacol*; 557:186-194, 2007.

Lopez-Lopez, J.G., Moral-Sanz, J., Frazziano., Maria, G. J., Gómez-Villalobos, Moreno, C. L., Flores-Hernandez, J., Lorente, J., Cogolludo y Perez-Vizcain, F. (2011). Type 1 Diabetes-Induced Hyper-Responsiveness to 5-Hydroxytryptamine in Rat Pulmonary Arteries via Oxidative Stress and Induction of Cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther*; 338(1):400.

Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H. y Takeshita, A. (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest*. 106(12):1521-30.

Matrougui, K., Maclouf, J., Lévy, B.I., Henrion, D. (1997). Impaired nitric oxide- and prostaglandin-mediated responses to flow in resistance arteries of hypertensive rats. *Hypertension*; 30:942– 947.

Mehta, P.K. y Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J PhysiolCell Physiol*; 292(1):c82-97.

Messner, B., Knoflach, M. y Seubert, A. (2009). Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and in vivo relevance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 29:1392–1398.

Mcgregor, B.Y. (1965). The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol*; 77:21-30 2.

Mitchell, J.A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L. y Harrington, L.S. (2008). Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp. Physiol*; 93(1):141-7.

Mollaoglu, H., Gokcimen, A., Ozguner, F., Oktem, F., Koyu, A. y Kocak, A. (2006). Caffeic acid phenethyl ester prevents cadmium-induced cardiac impairment in rat. *Toxicology* ; 227: 15–20. (Epub 2006 Jul 13).

Mulvany, M.J (2008) Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput*; 46(5):461-7.

Nair, D., Karen, S., Emmy, V. y Ann, C. (2013). Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)? *Ambily Ravindran. Int. J. Mol*; 14, 6116-6143.

Navas-Acien A, Selvin E, Sharrett AR, Calderon-Aranda E, Silbergeld E, et al. (2004) Lead, Cadmium, Smoking, and Increased Risk of Peripheral Arterial Disease. Circulation 109: 3196–3201.

Niwa, A. y Suzuki, A. (1982). Effects of cadmium on the tension of isolated rat aorta (a possible mechanism for cadmiuminduced hypertension). *J Toxicol Sci*; 7, 51–60.

Noll, G. y Luscher, T.F. (1998). The endothelium in acute coronary syndromes. *Eur Heart J*; 19: C30–C38.

Noonan, C., Sarasua, S., Campagna, D., Kathman, S.J., Lybarger, J.A. y Mueller, P.W. (2002). Effects of exposure to low levels of environmental cadmium on renal biomarkers. Environ Health Perspect; 110:151-5. 13.

Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica.

Nwokocha, C.R., Baker, A., Douglas, D., McCalla,G., Nwokocha, M., Brown, PD. (2013). Apocynin ameliorates cadmium-induced hypertension through elevation of endothelium nitric oxide synthase. *Cardiovasc Toxicol.* 13(4):357-63.

Obianime AW, Roberts II. (2009). Antioxidants, cadmium-induced toxicity, serum biochemical and the histo-logical abnormalities of the kidney and testes of the male Wistar rats. Niger. J Physiol Sci Dec 24: 177–185.

O'brien, P. y Salasinski, H.J. (1998). Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Arch Toxicol*: 72: 690–700.

Ognjanović, B.I., Marković, S.D., Pavlović, S.Z., Žikić, R.V., Štajn, A.Š. y Saičić, Z.S. (2008). Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: effect of selenium. *Physiol. Res*; 57, 403–411.

Oliveira, T.F., Batista, P.R., Leal, M.A., Campagnaro, B.P., Nogueira, B.V., Vassallo, D.V., Meyrelles, S.S. y Padilha, A.S. (2018). Chronic Cadmium Exposure Accelerates the Development of Atherosclerosis and Induces Vascular Dysfunction in the Aorta of ApoE-/- Mice. *Biol Trace Elem Res*.

Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E. y Epstein, S.E. (1990). Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*; 323:22-27.

Paravicini, T.M. y Touyz, R.M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care 31 Suppl*; 2:S170-80.

Parissis, J.T., Venetsanou, K.F., Mentzikof, D.G., Kalantzi, M.V., Georgopoulou, M.V., Chrisopoulos, N. y Karas, S.M. (2001). Plasma levels of soluble cellular adhesion molecules in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. *Eur. J. Intern. Med*; 12:350-356.

Pathak., N. y Khandelwal, S. (2007). Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicol Lett*;169: 95–108.

Plavnik, F.L., Ajzen, S.A., Christofalo, D.M., Barbosa, C.S y Kohlmann, O. Jr. (2007). Endothelial function in normotensive and high-normal hypertensive subjects. *J Hum Hypertens*; 21:467-472.

Plaza, M.1., Navas. A., Crainiceanu, C.M. y Guallar, E. (2008). Cadmium exposure and hypertension in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). Environ Health Perspect;116(1):51-6

Pràtico, D. (2005). Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis*; 181:215-224.

Preston, R.A., Ledford, M., Materson, B.J., Baltodano, N.M., Memon, A. y Alonso, A. (2002). Effects of severe, uncontrolled hypertension on endothelial activation: soluble vascular cell adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor. *J Hypertens*; 20:871-877.

Pryor, W. y Squadrito, G. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol*; 268:L699-L722.

Prozialeck, W.C., Lamar, P.C., Lynch, S.M. (2003). Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin, and beta-catenin in the proximal tubule epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15;189(3):180-95.

Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., Nebert, D.W., Woods, J.M., Barchowsky, A., Atchison W,D., (2008). The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol Sci*. (2):207-18.
Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., Woods, J.M.(2006).The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci.*13;79(16):1493-506.

Reddy, K.B., Yee, D., Hilsenbeck, S.G., Coffey, R.J. y Osborne, C.K. (1994). Inhibition of estrogen-induced breast cancer cell proliferation by reduction in autocrine transforming growth factor alpha expression. *Cell Growth Differ*; 5: 1275–1282.

Redon, J., Oliva, M.R., Tormos, C., Giner, V., Chaves, J., Iradi, A. y Saez, G.T. (2003). Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension*; 41:1096 –110.

Rikans, L.E. y Yamano, T. (2000). Mechanisms of cadmium mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem*; 14: 103–110.

Rochelle, E., Garner, Patrick, Levallois. (2017). Associations between cadmium levels in blood and urine, blood pressure and hypertension among Canadian adults. *Environ Res*; 155:64-72.

Rodrigo, R.y Rivera, G. (2003). Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles (Monografía). Laboratorio de 64.

Ross MH, Kaye GI y Paulina W (2003). Aparato cardiovascular, En: Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular. Ed. Panamericana, Philadelphia; pág. 328-435.

RJärup, L., Hellström, L., Alfvén, T., Carlsson, M.D., Grubb, A. y Persson, B. (2000). Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occup Environ Med*; 57:668-72.

Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Afshari, R., Farkhondeh, T. y Karimnezhad F. (2015). Effects of buprenorphine on balance of oxidant/antioxidant system in the different ages of male rat liver. *J Biochem Mol Toxicol*; 29: 249–253.

Satarug, S., Nishijo, M., Lasker, J.M., Edwards, R.J. y Moore, M.R. (2006). Kidney disfunction and hypertension: role for cadmium, P450 and heme oxygenases. *Tohoku J Exp Med*; 208, 179–202.

Sato, M. y Kondoh, M. (2002). Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med*;196: 9–22.

Serafim guimara y Daniel. Vascular Adrenoceptors: An Update Institute of Pharmacology and Therapeutics.Pharmacological reviews. 2001.

Serban, D.N., Nilius, B. y Vanhoutte, P.M. (2010). The endotelial saga: the past, the present, the future. *Pflugers Arch*; 459(6):787-792,

Sompamit, K., Kukongviriyapan, U., Donpunha, W., Nakmareong, S. y Kukongviriyapan, V. (2010). Reversal of cadmium-induced vascular dysfunction and oxidative stress by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in mice. *Toxicol. Lett;* 198, 77-82.

Schimidt, T.S. y Alp, N.J. (2007). Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endotelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond*); 113(2):47-63.

Schiffrin, E.L. (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*; 43(1):19-29.

Schildknecht, S. y Ullrich, V. (2009). Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem Biophys*; 84(2):183-9.

Schnackenberg, C.G. y Wilcox, C.S. (1999). Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin F_2alpha. *Hypertension*; 33:424428.

Skoczynska, A. y Stojek, E. (2005). The impact of subchronic lead poisoning on the vascular effect of nitric oxide in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*; 19:99–106.

Smyth, E.M. (2010). Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clin Lipidol*; 5(2):09-219.

Stankevicius, E., Kevelaitis, E. y Simonsen, U. (2003). Role of nitric oxide and other endothelium derived factor. Medicina (Kaunas); 39(4):333-41.

Stevens, G., Dias, R.H., Thomas, K.J.A., Rivera, J.A. y Carvalho, N. (2008) Characterizing the epidemiological transition in Mexico: National and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLoS Med*; 5(6): e125.

Szuster, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kaminska, T., Sniezko, R. y Paduch, R. (2000). The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxiology*; 145: 159–171.

Tandon, S.K., Singh, S., Prasad, S., Khandekar, K., Dwivedi, V.K., Chatterjee, M., y Mathur, N. (2003). Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol Lett*; 145: 211–217.

Tang, E.H. y Vanhoutte P.M. (2010) Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension?. Pflugers Arch. 2010; 459(6):995-1004.

Takahashi, Y., Poteser, M., Masui, H., Koizumi, N. y Wakabayashi, I. (2004). Effects of cadmium in vitro on contractile and relaxant responses of isolated rat aortas. *Environ Health Prev Med*; 9(6): 251–6.

Tellez-Plaza M., Jones M.R., Dominguez-Lucas A., Guallar E., Navas-Acien A. (2013). Cadmium Exposure and Clinical Cardiovascular Disease: A Systematic Review. Curr. Atheroscler. Rep;15:356.

Thévenod, F. (2009). Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 238, 221–239.

Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M. y Biswal, S. (2002) Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*. 62, 5196–5203.

Thomas, B.J. y Wanstall, J.C. (2003). Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia. *Eur J Pharmacol*; 477:153–161.

Tzotzes, V.1., Tzilalis, V., Giannakakis, S., Saranteas, T., Papas, A., Mourouzis, I., Mourouzis, C., Zarros, A., Pantos, C., Cokkinos, D. y Carageorgiou, H. (2007). Effects of acute and chronic cadmium administration on the vascular reactivity of rat aorta. *Biometals*; 2007; 20(1):83-91.

Treviño S, Waalkes MP, Flores Hernández JA, León-Chavez BA, Aguilar-Alonso P, Brambila E. (2015). Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. Biochem Biophys; 583:27-35.

Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Tang, E.H. y Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf);* 196(2):193-222.

Voors, A.W., Shuman, M.S. y Johnson, W.D. (1982). Additive statistical effects of cadmium and lead on heart-related disease in a North Carolina autopsy series. *Arch. Environ. Heal*; 37, 98–102.

Wang, S.J., Paek, D.M., Kim, R.H., y Cha, B.S. (2000). Variation of systolic blood pressure in rats exposed to cadmium and nickel. Environ Res; 88, 116–119.

Watanabe, T., Barker, T.A. y Berk, B.C. (2005). Angiotensin II and the Endotheliun: Diverse Signals and Effects. Hypertension; 45:163-169.

Webb, R.C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ;* 27(1-4):201-6.

Weissmannb A. y Katrin S. (2014) Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation Ralf P. Brandesa,n, Norbert Free Radical Biology and Medicine. 2014; 208-226.

Weseler, A.R y Bast, A. (2010). Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. Curry Hypertens Rep; 12(3):154-61.

Wind, S., Beuerlein, K., Armitage, M.E., Taye, A., Kumar, A.H., Janowitz, D., Neff, C., Shah, A.M. y Wingler, K. y Schmidt, H.H. (2010). Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension*, 56(3):490-7.

Wu, C.C., Sung, F.C., Chen, Y.C. (2018). Arsenic, Cadmium and Lead Exposure and Immunologic Function in Workers in Taiwan. *Int J Environ Res Public Health*; 5;15(4):683.

Yoopan, N., Watcharasit, P., Wongsawatkul, O., Piyachaturawat, P. y Satayavivad, J. (2008). Atenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. *Toxicol Lett*; 157–161.

Yoneyama, H., Yamamoto, A. y Kosaka, H. (2001). Neuronal nitric oxide synthase generates superoxide from the oxygenase domain. *Biochem J*: 360(Pt 1):247-53.

Zalba, G., Beaumont, F.J., San José, G., Fortuño, A., Fortuño, M.A. y Díez, J. (2001). Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant*;16 Suppl 1:2-5.

Zalups, R.K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol*; Rev 52: 113–143.